

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 115**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/70**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06706287 .7**

96 Fecha de presentación: **17.01.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1838881**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.10.2007**

54 Título: **Procedimiento para la detección de HPV, y sondas, cebadores y kits**

30 Prioridad:  
**18.01.2005 GB 0500996**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.05.2012**

73 Titular/es:  
**DDL DIAGNOSTIC LABORATORY B.V.  
FONTEIJNENBURGH LAAN 7  
2275 CX VOORBURG, NL y  
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**

72 Inventor/es:  
**COLAU, Brigitte Desiree Alberte;  
KLETER, Gijsbertus Everardus Maria;  
QUINT, Wilhelmus Gregorius;  
VAN ALEWIJK, Dirk Cornelis Jerrefaas Gelde;  
VAN DEN MUNCKHOF, Henricus Arno Marie y  
VAN DOORN, Leendert Jan**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 380 115 T3

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección del HPV, y sondas, cebadores y kits

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de la detección e identificación de infecciones provocadas por el Virus del Papiloma Humano (HPV).

**Antecedentes de la invención**

El cáncer de cuello uterino es el segundo tumor maligno más común en mujeres después del cáncer de mama. El carcinoma del cuello uterino es único en cuanto a que es el primer tumor sólido principal en el que se encuentra ADN del HPV en casi todos los casos y en las lesiones precursoras a nivel mundial.

10 Se han caracterizado más de 100 tipos de HPV y se enumeran por orden cronológico del aislamiento. El HPV es epiteliotrópico e infecta únicamente la piel (tipos cutáneos) o la mucosa del tracto respiratorio y anogenital (tipos mucosos). Se conocen más de 40 tipos de HPV que infectan el cuello uterino. En base a las lesiones benignas, premalignas o malignas provocadas, el HPV se divide en tipos de bajo riesgo (p. ej., tipos 6, 11, 42, 43 y 44 del HPV) y tipos de alto riesgo (p. ej., tipos 16, 18, 31, 33 y 45), respectivamente. Los tipos de alto riesgo son responsables de más del 99% de todos los cánceres de cuello uterino invasivos. Por consiguiente, la detección e identificación de los tipos de HPV es muy importante. Los tipos de alto riesgo se encuentran por definición sistemáticamente en las LIE (Lesiones Intraepiteliales Escamosas) de alto grado y en carcinomas *in situ*, mientras que los tipos de bajo riesgo se encuentran principalmente en LIE de bajo grado. Esta observación epidemiológica se basa en descubrimientos moleculares. Por ejemplo, las proteínas E6 y E7 de los tipos de bajo riesgo 6 y 11 se unen a p53 y pRB demasiado débilmente para inmortalizar los queratinocitos *in vitro* o para provocar la transformación maligna *in vivo* (Woodworth *et al.*, 1990). El genoma de ADN bicatenario circular de los tipos de HPV de bajo riesgo sigue siendo episomal, mientras que el genoma de los tipos de HPV de alto riesgo es capaz de integrarse en el genoma humano.

15 El rastreo de los trastornos malignos y premalignos del cuello uterino se realiza habitualmente según el sistema de Papanicolaou (PAP). Se examinan frotis cervicales mediante microscopía luminosa y las muestras que contienen células morfológicamente anormales se clasifican como PAP I a V, en orden ascendente de gravedad de la lesión. El procedimiento citomorfológico es un procedimiento indirecto y mide el posible resultado de una infección por HPV. Por lo tanto, la detección y tipificación del ADN del HPV es importante en el rastreo secundario para seleccionar pacientes para su control (seguimiento) y tratamiento. Esto significa que los frotis cervicales clasificados como PAP II (metaplasia escamosa atípica) o clases superiores se han de analizar en busca de los tipos de HPV de bajo riesgo y de alto riesgo. 20 Los estudios de seguimiento han demostrado que sólo los tipos de HPV de alto riesgo están implicados en la progresión de las células de cuello uterino citológicamente normales hacia las LIE de alto grado (Remminck *et al.*, 1995). Estos resultados indican que la presencia de los tipos de HPV de alto riesgo es un marcador de pronóstico del desarrollo y la detección del cáncer de cuello uterino.

25 El diagnóstico del HPV mediante cultivo no es posible. Además, el diagnóstico mediante la detección de los anticuerpos contra el HPV parece estar dificultada por una sensibilidad y una especificidad insuficientes. Los procedimientos directos para diagnosticar una infección por HPV se basan principalmente en la detección del genoma del ADN viral mediante diferentes formatos de hibridación de ADN/ADN o ARN/ADN con o sin una amplificación previa del ADN de HPV. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un procedimiento que es muy eficiente para la amplificación de cantidades mínimas de ADN diana. Actualmente, se usan principalmente tres pares de cebadores diferentes para la amplificación universal del ADN del HPV ("cebadores de amplio espectro"). Tres de estos pares de cebadores, MY11/MY09, GP5/GP6 y el sistema SPF10, se dirigen hacia regiones conservadas entre los diferentes tipos de HPV de la región LI (Manos *et al.*, 1989; Van den Brule *et al.*, 1990, WO9914377). También se usa el sistema PGMY, una modificación del MY09/11 (véase Gravitt, P., 2000. "Improved amplification of genital human papillomaviruses". *J. Clin. Microbiol.* 38:357-361). Otro par de cebadores, CPI/CPII, se dirige a regiones conservadas de la región E1 (Tieben *et al.*, 1993), pero CPI/II no se usa habitualmente. 35

Hay varios procedimientos para identificar los diversos tipos de HPV.

30 El ADN del HPV se puede tipificar mediante cebadores de PCR que sólo reconocen un tipo específico. Este procedimiento se conoce como PCR específica de tipo. Dichos procedimientos se han descrito para los tipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31 y 33 (Claas *et al.*, 1989; Cornelissen *et al.*, 1989; Falcinelli *et al.*, 1992; Van den Brule *et al.*, 1990; Young *et al.*, 1989). Los cebadores se dirigen a las regiones E5, L1, E6, L1, E2 y E1 del genoma del HPV para los tipos 6, 11, 16, 18, 31 y 33, respectivamente (Baay *et al.*, 1996).

35 Otro procedimiento es la amplificación general de una parte genómica de todos los tipos de HPV seguida de la hibridación con dos cócteles de sondas específicas de tipo que diferencian entre los grupos oncogénicos y no oncogénicos, respectivamente. Se ha descrito un procedimiento de tipificación similar descrito sin amplificación previa del ADN del HPV. En el ensayo de captura de híbridos (Hybrid Capture Sharp Assay; Digene, Silver Springs, MD), se analiza cada muestra para un grupo de tipos de HPV de "alto riesgo" (p.ej., 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y para otro grupo de tipos de HPV de "bajo riesgo" (p.ej., 6, 11, 42, 43 y 44) (Cox *et al.*, 1995).

Un sistema de detección y tipificación revelado en el documento WO9914377 utiliza una etapa de amplificación por PCR y una hibridación de transferencia inversa de líneas con sondas específicas de tipo.

5 En la actualidad, la clasificación formal del virus del papiloma humano se basa en el análisis secuencial de un fragmento de 291 pb de la región L1 (Chan *et al. J Virol.*, mayo de 1995; 69(5):3074-83, DeVilliers *et al., Virology.*, 20 de junio de 2004; 324(1):17-27). El análisis filogenético de estas secuencias permite la clasificación de los diferentes tipos de HPV. Por definición, si la diferencia secuencial en esta región entre dos aislados de HPV es mayor del 10%, se clasifican como tipos diferentes. Por consiguiente, si la secuencia difiere en más del 10% de cualquier tipo de HPV conocido, se clasifica como un nuevo tipo de HPV. Los aislados de HPV que difieren entre 2-10% se clasifican como subtipos diferentes. Finalmente, si la variación secuencial es inferior al 2%, los 2 aislados se clasifican dentro del mismo subtipo como variantes diferentes.

El documento W099/14377 revela un procedimiento para la detección del HPV en una muestra biológica.

Todavía existe la necesidad de mejores sistemas de detección y tipificación.

### **Descripción de la invención**

15 La presente invención se refiere a un procedimiento para tipificar cualquier ácido nucleico del HPV que pueda estar presente en una muestra, procedimiento que comprende las etapas de poner en contacto cualquiera de dichos ácidos nucleicos con al menos una sonda capaz de hibridarse específicamente con la región B del HPV, estando dicha región indicada en la Figura 1, y luego analizar el/los tipo/s de HPV en base al resultado de la hibridación así obtenido.

La invención se refiere además a un procedimiento en el que se lleva a cabo una etapa de amplificación para amplificar cualquier ácido nucleico del HPV que pueda estar presente en una muestra biológica antes de la etapa de hibridación.

20 Como tal, la invención se refiere a un procedimiento para la detección y/o la tipificación de cualquier ácido nucleico del HPV que pueda estar presente en una muestra biológica, procedimiento que comprende las etapas de:

(i) amplificar un fragmento de ácido polinucleico que comprende la región B de cualquier ácido nucleico del HPV de la muestra, estando dicha región B indicada en la Figura 1, y

25 (ii) poner en contacto cualquiera de los fragmentos amplificados de la etapa (i) con al menos una sonda capaz de hibridarse específicamente con la región B del HPV, estando dicha región B indicada en la Figura 1.

La invención también se refiere a un procedimiento para la detección y/o la tipificación del HPV que pueda estar presente en una muestra biológica, procedimiento que comprende:

(i) amplificar un fragmento de ácido polinucleico del HPV mediante el uso de:

30 - un cebador 5' que se hibride específicamente con la región "A" del genoma del HPV 16, estando dicha región "A" indicada en la Figura 1 y

- un cebador 3' que se hibride específicamente con la región "C" del genoma de al menos un tipo de HPV, estando dicha región "C" indicada en la Figura 1;

(ii) hibridar los fragmentos amplificados de la etapa (i) con al menos una sonda capaz de hibridarse específicamente con la región "B" del HPV, estando dicha región B indicada en la Figura 1.

35 La invención se refiere además a un procedimiento en el que se lleva a cabo una etapa de amplificación para amplificar cualquier señal usada para detectar la hibridación de la sonda con cualquier ácido nucleico del HPV que pueda estar presente en una muestra biológica. La amplificación de la señal se puede producir con o sin una etapa de amplificación de cualquier ácido nucleico del HPV que pueda estar presente en la muestra.

40 La invención se refiere además a un procedimiento para tipificar cualquier ácido nucleico del HPV que pueda estar presente en una muestra biológica, procedimiento que comprende una etapa para detectar la presencia de cualquier ácido nucleico del HPV presente en una muestra antes de o simultáneamente a cualquier etapa de tipificación.

La invención se refiere además a sondas y cebadores de oligonucleótido que permiten dicho procedimiento de detección y/o identificación del HPV.

45 La invención se refiere además a protocolos según los cuales se pueden realizar dichas etapas de amplificación e hibridación. Un formato para la etapa de hibridación es, por ejemplo, el formato de hibridación inversa.

La invención se refiere además a kits que comprenden cebadores y/o sondas y/o instrucciones para su uso en la realización de la invención.

**Figuras**

- La Figura 1 ilustra una alineación de diferentes secuencias del HPV con referencia a la secuencia de una secuencia del HPV 16 con número de acceso del banco de genes K02718.1 y muestra la ubicación de las regiones A, B, C y D.
- 5 La Figura 2 ilustra el árbol filogenético de la región B.
- La Figura 3 ilustra un ejemplo de un producto de PCR usando cebadores de PCR simples.
- La Figura 4 ilustra una PCR múltiplex sobre gel.
- La Figura 5 ilustra los resultados que se pueden obtener usando un ensayo de sonda lineal.
- 10 La Figura 6 ilustra un procedimiento general para la detección y la tipificación de ADN usando el enfoque Luminex (basado en perlas).
- La Figura 7 ilustra un posible ensayo de genotipificación del “MPF” del HPV; y
- La Figura 8 ilustra patrones de genotipificación del “MPF” de los tipos del HPV 16, 18, 26, 31, 33 y 35.

**Descripción detallada**

- 15 La presente invención se refiere en general a un procedimiento para la detección y/o la tipificación de cualquier ácido nucleico del HPV que pueda estar presente en una muestra biológica, procedimiento que comprende las etapas de poner en contacto cualquiera de dichos ácidos nucleicos presente con al menos una sonda capaz de hibridarse específicamente en la región B del genoma del HPV, estando dicha región B indicada en la Figura 1, y luego detectar cualquier hibridación específica que pudiera producirse para determinar si hay ácido nucleico del HPV en la muestra y a qué tipo de HPV pudiera pertenecer.
- 20 Se ha determinado que la región D de 77 nucleótidos del genoma del HPV (véase la Figura 1) y, especialmente, los 31 nucleótidos de la región B que se encuentran entre los cebadores, aporta mucha información sobre la tipificación del HPV.
- Así pues, el procedimiento de la invención comprende en general la hibridación del ácido nucleico del HPV con una sonda capaz de hibridarse con la región B del HPV, de manera que dicha hibridación, o incluso la ausencia de
- 25 hibridación, proporciona información que permite diferenciar entre diferentes tipos del HPV.
- La hibridación de la sonda con el ácido nucleico diana tiene lugar en condiciones de reacción en las que puede ocurrir una hibridación específica de la sonda.
- El análisis del/de los tipos de HPV presente/s en la muestra se puede llevar a cabo a diferentes niveles de resolución.
- El análisis puede ser a una resolución adecuada para identificar tipos individuales del HPV, tales como el HPV 16, 18 o el HPV 1, por ejemplo.
- 30 El análisis de los tipos también se puede llevar a cabo a una resolución inferior, por ejemplo, para identificar si un individuo tiene algún tipo de HPV de una categoría dada, tal como un tipo de alto riesgo oncológico o un tipo de bajo riesgo oncológico, o un tipo cutáneo.
- El análisis de tipificación de la presente invención es adecuadamente capaz de proporcionar información sobre todos los tipos específicos encontrados en una muestra, no obstante, puede que no sea necesario (desde el punto de vista del usuario) que pueda diferenciar entre tipos exactos del HPV, y puede que sólo sea necesario un resultado del análisis a nivel de las categorías de los tipos del HPV.
- 35 Por tanto, la invención se refiere a un procedimiento de tipificación del HPV, procedimiento que permite la identificación de los tipos de HPV de alto riesgo sin indicar qué tipo de alto riesgo específico está presente en una muestra.
- 40 La categoría de los tipos de alto riesgo (aquellos encontrados sistemáticamente en las LIE [Lesión Intraepitelial Escamosa] de alto grado y los carcinomas *in situ*) incluyen los HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68.
- La categoría de los tipos de bajo riesgo (principalmente encontrados en las LIE de bajo grado) incluyen los tipos del HPV 6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 40 54, 70 y 74.
- 45 Preferentemente, las sondas específicas usadas en la invención son capaces de hibridarse específicamente con la región “B” de 31 nucleótidos, cuando esta región se da por referencia a la secuencia de la Figura 1. Estas regiones corresponden a los nucleótidos 6566-6596 (región B) de la secuencia de referencia del HPV 16 K02718.
- Se reconocerá que la referencia a las regiones D y B usando la numeración de la Figura 1 de la presente memoria

incluye las regiones equivalentes de otras secuencias del HPV que no están específicamente enumeradas y que pueden variar con respecto a la secuencia de referencia del HPV u otras secuencias dadas. Es posible identificar una región A, B, C o D equivalente de otro genoma del HPV en base a, por ejemplo, la homología o la identidad secuencial con las secuencias de la Figura 1.

5 Cualquier experto en la técnica puede llevar a cabo fácilmente comparaciones de la identidad/homología de ácidos nucleicos de las secuencias, por ejemplo, usando los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402 (1977), y Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 se pueden usar, por ejemplo, con los parámetros por defecto para determinar el porcentaje de identidad secuencial de los polinucleótidos de la invención. El programa informático para realizar los análisis BLAST se encuentra a disposición del público en el Centro Nacional de Información Biotecnológica.

Así pues, se puede ver que la invención se refiere a sondas y al uso de sondas que son capaces de hibridarse específicamente con la región D, adecuadamente, con la región B del HPV, estando dichas regiones indicadas en la Figura 1 o que son capaces de hibridarse específicamente con una región equivalente de otro genoma del HPV, siendo la región equivalente analizada mediante identidad y/o homología de los ácidos nucleicos. Para evitar dudas, todas las sondas descritas en la presente memoria se reivindican individualmente y en grupos de (cuando sea apropiado) al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 sondas, siendo los grupos seleccionados de las tablas en las que están enumeradas las sondas.

La presente revelación también se refiere a fragmentos de ácidos nucleicos que consisten esencialmente en la región D aislada de 77 pares de bases y la región B aislada de 31 pares de bases, estando cualquier región en forma de ácido nucleico mono o bicatenario, en forma de ARN o de ADN, y al uso de estas regiones de fragmentos de ácidos nucleicos en la tipificación del HPV.

Una característica de la presente invención es la selección de sondas.

Las sondas que se hibridan específicamente con las regiones B del genoma del HPV son preferentemente capaces de proporcionar información (mediante los resultados de la hibridación) en cuanto al tipo de cepa del HPV presente, bien sola o en combinación con la información procedente de otra sonda o sondas. La información sobre el tipo de HPV se obtiene preferentemente mediante la detección positiva de la hibridación de una sonda con ácido nucleico diana, pero también se puede obtener por la ausencia de hibridación de una sonda dada.

Lo adecuado es que una sonda de la presente invención sea capaz de hibridarse específicamente con la región B del genoma de un único tipo de HPV, permitiendo, por tanto, la identificación específica de este tipo de HPV, cuando este tipo esté presente en una muestra biológica.

Por lo tanto, una realización de la invención se refiere a un procedimiento para tipificar cualquier ácido nucleico de HPV que pueda estar presente en una muestra biológica, procedimiento que comprende las etapas de poner en contacto cualquiera de dichos ácidos nucleicos con al menos una sonda capaz de hibridarse específicamente con la región B del genoma de un único tipo de HPV, estando dichas regiones indicadas en la Figura 1, y luego analizar el/los tipo/s de HPV en base al resultado de la hibridación así obtenido.

Una sonda de la presente invención puede incluso proporcionar información útil si es capaz de hibridarse específicamente con la región B del genoma de un número limitado de tipos, tal como sólo 2 tipos de HPV. Por ejemplo, esto puede permitir la identificación de estos tipos o puede permitir la identificación específica de cada tipo en combinación con la información de otra sonda.

Las sondas capaces de dar información sobre los tipos de HPV, tales como las anteriores, se consideran en general sondas específicas de tipo en la presente memoria. Las sondas específicas de tipo preferidas son capaces de hibridarse específicamente con la región B del genoma de un único tipo de HPV. Según otra realización preferida de la presente invención, una sonda capaz de hibridarse específicamente con la región B del genoma de un único tipo de HPV, más concretamente, se hibrida específicamente con la región B de 31 pb situada entre la región A y la región C, según lo indicado en la Figura 1.

Los diferentes tipos de HPV de una muestra se pueden identificar mediante la hibridación de los ácidos nucleicos de dichos tipos de HPV con al menos una, preferentemente, con al menos dos, más preferentemente, con al menos tres, incluso más preferentemente, con al menos cuatro, y lo más preferentemente, con al menos cinco sondas de oligonucleótido.

La Tabla 4 contiene una lista de las sondas preferidas que se hibridan específicamente con la región D. Estas sondas se pueden usar conjuntamente, adecuadamente, en las mismas condiciones de hibridación y lavado. Se prefiere un formato de hibridación inversa, tal como, por ejemplo, un formato de ensayo de sonda lineal. Todas las sondas enumeradas se reivindican individualmente en la presente memoria. Además, en la presente memoria, se contemplan todas las combinaciones de sondas.

55

Las sondas enumeradas en la Tabla 4 se hibridan específicamente con la región B y/o D del HPV y son capaces de proporcionar información sobre tipos específicos de ácido nucleico diana del HPV que pueden estar presentes en una muestra.

- 5 Será evidente para el experto en la técnica que es posible seleccionar otras sondas distintas a las enumeradas en la Tabla 4 en dicha región B, preferentemente, sondas que se hibriden específicamente únicamente con un solo tipo de HPV y/o que sean capaces de proporcionar información que permita la determinación del tipo de HPV.

Las sondas para su uso en la presente invención pueden tener una secuencia espaciadora adicional que no forme parte de la propia sonda, pero que, por ejemplo, permita la unión a un soporte sólido. La región espaciadora se puede añadir enzimática o químicamente y puede estar 5' o 3' de la sonda.

- 10 Lo adecuado es que el uso de las sondas de la invención permita tipificar el menos 5 tipos diferentes de HPV, preferentemente, al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o al menos 51 tipos diferentes de HPV. Lo más preferente es que la presente invención permita diferenciar más de 30 tipos diferentes de HPV, adecuadamente, más de 35, más de 40, más de 45 y, adecuadamente, más de 50 tipos diferentes de HPV.

- 15 Lo adecuado es que todos los tipos de HPV dados en el árbol filogenético de la Figura 2, o sustancialmente todos, se puedan diferenciar usando la invención resumida en la presente memoria.

- 20 Cualquier ácido nucleico del HPV presente en la muestra, preferentemente, primero se amplifica, por ejemplo, mediante PCR u otro procedimiento de amplificación adecuado antes de la hibridación. La amplificación de cualquier ácido nucleico diana se puede llevar a cabo usando los denominados cebadores o conjuntos de cebadores de "amplio espectro" que permitan la amplificación de todo el ácido nucleico de HPV de una muestra independientemente del tipo.

La referencia al ácido nucleico del HPV presente en una muestra incluye por tanto el ácido nucleico que ha sido amplificado de una muestra cuando es obvio a partir del contexto (i.e., hay una etapa de amplificación presente antes de la hibridación).

- 25 Lo adecuado es que la amplificación de cualquier ADN diana incluya la amplificación de la región B de 31 nucleótidos de la Figura 1.

Así pues, en una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para la detección y/o la tipificación de cualquier ácido nucleico del HPV que pueda estar presente en una muestra biológica, procedimiento que comprende las etapas de:

- 30 (i) amplificar un fragmento de ácido polinucleico que comprenda la región B de cualquier ácido nucleico del HPV de la muestra, estando dicha región B indicada en la Figura 1, y

(ii) poner en contacto cualquier fragmento amplificado de la etapa (i) con al menos una sonda capaz de hibridarse específicamente con la región B del HPV, estando dicha región B indicada en la Figura 1.

Lo adecuado es que la amplificación de cualquier ácido nucleico diana incluya la amplificación del fragmento de 77 nucleótidos de la Figura 1, i.e., la región D de la Figura 1.

- 35 Así pues, en una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para la detección y/o la tipificación de cualquier ácido nucleico del HPV que pueda estar presente en una muestra biológica, procedimiento que comprende las etapas de:

(i) amplificar un fragmento de ácido polinucleico que comprenda la región D de cualquier ácido nucleico de HPV de la muestra, estando dicha región D indicada en la Figura 1, y

- 40 (ii) poner en contacto cualquier fragmento amplificado de la etapa (i) con al menos una sonda capaz de hibridarse específicamente con la región B del HPV, estando dicha región B indicada en la Figura 1.

En otra realización más, la invención proporciona un procedimiento para la detección y/o la tipificación del HPV que pueda estar presente en una muestra biológica, procedimiento que comprende:

(i) amplificar un fragmento de ácido polinucleico del HPV mediante el uso de:

- 45 - un cebador 5' que se hibride específicamente con la región "A" del genoma del HPV 16, estando dicha región "A" indicada en la Figura 1 y

- un cebador 3' que se hibride específicamente con la región "C" del genoma de al menos un tipo de HPV, estando dicha región "C" indicada en la Figura 1;

- 50 (ii) hibridar los fragmentos amplificados de la etapa (i) con al menos una sonda capaz de hibridarse específicamente con la región "B", estando dichas regiones indicadas en la Figura 1.

Lo adecuado es que la región que se vaya a amplificar comprenda los 77 nucleótidos 6543-6619 de la región D del genoma del HPV, siendo esta numeración dada por referencia a la secuencia de referencia del HPV 16 de la Figura 1, o que consista en esta región o que consista esencialmente en esta región.

5 Lo adecuado es que la región que se vaya a amplificar no sea mayor que el fragmento 6543-6619 del genoma del HPV, siendo la numeración dada con referencia a la secuencia de referencia del HPV 16 o una región equivalente de otros genomas del HPV.

10 Según otra realización preferida de la presente invención, el extremo 3' de dicho cebador 5' que se hibrida específicamente con la región A del genoma de al menos un tipo de HPV está situado en la posición 6565 del genoma del HPV 16 (cepa de referencia con número de acceso del banco de genes K02718.1), o en la correspondiente posición de cualquier otro genoma del HPV, según lo indicado en la Figura 1.

Según otra realización preferida de la presente invención, el extremo 3' de dicho cebador 3' que se hibrida específicamente con la región C del genoma de al menos un tipo de HPV está situado en la posición 6597 del genoma del HPV 16 (número de acceso del banco de genes K02718.1), o en la correspondiente posición de cualquier otro genoma del HPV, según lo indicado en la Figura 1.

15 Los cebadores preferidos para la amplificación de ácido nucleico en una muestra incluyen los enumerados en las Tablas 1 y 2. Éstos se reivindican individualmente y en forma de combinaciones. Se prefieren los pares de cebadores que comprenden un cebador directo y uno inverso.

20 Lo adecuado es que los cebadores para la amplificación general del ácido nucleico del HPV antes de la tipificación específica sean capaces de amplificar todo el ácido nucleico del HPV presente en la muestra. Se prefieren los grupos de cebadores que son capaces de realizar la amplificación de todo el ácido nucleico del HPV de una muestra, adecuadamente, el grupo que comprende uno o más cebadores del conjunto enumerado en las Tablas 1 y 2. Opcionalmente, se pueden usar todos los cebadores enumerados en las Tablas 1 y 2. Lo adecuado es que las combinaciones de cebadores sean capaces de usarse en las mismas condiciones de reacción.

25 La amplificación del ácido nucleico se puede llevar a cabo en cualquier fragmento adecuado que comprenda la región D o B de la invención. Los fragmentos preferidos para la amplificación son de menos de 200 nucleótidos, preferentemente, de menos de 150 nucleótidos, preferentemente, de menos de 100 nucleótidos de longitud. Los fragmentos preferidos para la amplificación son lo suficientemente cortos para permitir la detección tanto en frotis cervicales como en muestras embebidas, por ejemplo, en parafina.

30 En otro aspecto de la invención, los cebadores y las sondas revelados en la presente invención también se pueden usar en protocolos de PCR cuantitativa o protocolos de hibridación cuantitativa. La PCR cuantitativa (QPCR) permite la cuantificación de cantidades iniciales de moldes de ADN, ADNc o ARN. La QPCR se puede basar en la detección de una molécula indicadora fluorescente que aumente a medida que se vaya acumulando el producto de la PCR con cada ciclo de amplificación. Las moléculas indicadoras fluorescentes incluyen colorantes que se unen a ADN bicatenario (i.e. SYBR Green I) o sondas específicas de una secuencia (i.e. sondas de Molecular Beacons o sondas TaqMan®).

35 Según lo tratado anteriormente, ciertas sondas pueden proporcionar información sobre el tipo exacto de HPV, por ejemplo, si son capaces de hibridarse con un tipo dado, pero no con otros tipos (i.e., sondas específicas de tipo). Las sondas que son específicas de la región D también se pueden usar para determinar de manera más general si hay algún ácido nucleico del HPV presente en la muestra sin dar necesariamente información sobre el tipo. Dichas sondas se pueden denominar en la presente memoria "sondas universales". Las muestras que den positivo en ácido nucleico del HPV luego se pueden tipificar específicamente usando procedimientos de tipificación específicos, tales como sondas específicas de tipo o PCR específica de tipo. Alternativamente, las muestras se pueden tanto sondear con sondas universales como tipificar de manera específica simultáneamente.

45 Las sondas universales pueden contener residuos de inosina como parte de la secuencia de la sonda de ácido nucleico, lo que permite cierta flexibilidad en la hibridación con el ácido nucleico diana, y pueden permitir la hibridación con la región D de diferentes tipos de HPV. Opcionalmente, los cebadores también pueden contener inosina, cuando sea útil.

50 Para que no haya lugar a dudas, las sondas que se hibridan específicamente con la región D y/o B de cualquier ácido nucleico del HPV en una muestra pueden ser sondas universales (si se hibridan con múltiples tipos de HPV en la región D o la región B y/o no aportan información de tipificación específica) o sondas específicas de tipo, que permiten tipificar un ácido nucleico del HPV desconocido.

Cuando se amplifica el ADN diana antes de la tipificación, entonces también se pueden usar las sondas universales que pertenezcan a las regiones D o B preferidas para detectar el ácido nucleico del HPV.

Por lo tanto, la invención también se refiere a sondas o grupos de sondas que sean capaces de detectar la presencia de cualquier ácido nucleico del HPV en una muestra.

Las sondas universales se pueden usar para detectar ácido nucleico del HPV, p.ej., usando la técnica de inmunoensayo enzimático de ADN (DEIA), por ejemplo, según lo referido en el documento WO9914377, y descrita, por ejemplo, en *Clin Diagn Virol.*, febrero de 1995; 3(2): 155-64. Este procedimiento se usa para una detección rápida y específica de productos de PCR. Los productos de la PCR son generados por un conjunto de cebadores del cual bien el cebador directo o el cebador inverso contienen biotina en el extremo 5'. Esto permite la unión de los amplímeros biotinilados con los pocillos de microtitulación revestidos con estreptavidina. Los productos de la PCR se desnaturalizan mediante hidróxido de sodio, lo que permite la eliminación de la cadena no biotinilada. Las sondas de oligonucleótido marcadas específicas (p. ej., con digoxigenina) se hibridan con el producto de la PCR inmovilizado monocatenario y los híbridos se detectan mediante el conjugado marcado enzimáticamente y procedimientos colorimétricos o fluorimétricos.

En la presente invención, se proporciona un grupo de sondas universales adecuadas para la determinación de la presencia de ácido nucleico del HPV en una muestra, adecuadamente, en la técnica de DEIA. Lo adecuado es que dichas sondas se puedan usar en las mismas condiciones de reacción. Las sondas preferidas se dan en la Tabla 3. Todas las sondas descritas en la misma se reivindican individualmente y en combinación. La invención proporciona adecuadamente una combinación de 2 sondas cualquiera de la Tabla 3, adecuadamente de 3 y 4, y de 5 o más sondas cualquiera para la detección general del HPV (i.e., la detección de cualquier tipo de HPV), preferentemente, todas las sondas incluidas en la Tabla 3.

Una realización separada la invención se refiere al uso de sondas universales que se hibridan específicamente con la región D del genoma del HPV, tales como aquéllas que figuran en la Tabla 3, en combinación con una etapa posterior o simultánea de tipificación.

Tras la hibridación entre la sonda y cualquier ADN diana, la detección de la hibridación se puede llevar a cabo mediante cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, se puede marcar detectablemente la sonda y/o la diana de ácido nucleico. Para ayudar en la detección, es preferible amplificar la diana y/o la señal. Se prefiere especialmente la amplificación por PCR del ADN diana.

La hibridación entre la sonda y la diana se lleva a cabo preferentemente en presencia de un soporte sólido, aunque no es obligatorio. Se pueden inmovilizar una o más de las sondas y ácidos nucleicos diana, por ejemplo, fijarlos sobre perlas, placas, portaobjetos o placas de microtitulación. Alternativamente, puede que no esté inmovilizada ni la sonda ni la diana. La hibridación se puede llevar a cabo en el contexto de un medio líquido.

La detección de la unión se puede llevar a cabo usando citometría de flujo, por ejemplo, usando un sistema de citometría de flujo Luminex™ (véase, por ejemplo, el documento WO9714028 y <http://www.luminexcorp.com/>).

En los ejemplos de la presente memoria, se revelan sondas específicas de dianas y mezclas de diferentes sondas específicas de dianas para su uso con sistemas de detección basados en perlas, tales como Luminex, siendo realizaciones de la presente invención *per se*. Las mezclas pueden incluir de 2-100 tipos de sondas diferentes, tales como 5-70, 10-60, 20-50 tipos de sondas, incluyendo mezclas de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o más tipos de sondas diferentes. Dichas sondas acopladas a secuencias espaciadoras, y cuando están acopladas a perlas, según lo descrito en la presente memoria también forman parte de la presente invención *per se*.

Lo adecuado es que las perlas que se usan en la presente invención, también denominadas en la presente memoria microesferas, sean perlas adecuadas para su uso en análisis de citometría de flujo. Lo adecuado es que las perlas sean capaces de acoplarse a una sonda para detectar la interacción entre una sonda y una diana. En un aspecto, las perlas están marcadas con una única molécula fluorescente o una combinación de moléculas. Lo adecuado es que el marcador que se encuentre sobre o en las perlas se pueda identificar mediante el uso de excitación láser de uno o más fluorocromos dentro de la perla. En un aspecto, la perla es una perla de poliestireno.

La detección de la unión también se puede llevar a cabo en el contexto de un chip de ADN, usando, por ejemplo, los procedimientos descritos en los documentos EP373203, EP386229, EP0804731 y EP619321. Dichas técnicas son ampliamente conocidas por los expertos en la técnica.

Según otra realización preferida de la presente invención, los procedimientos anteriormente mencionados de detección y/o identificación del HPV se caracterizan además porque la etapa de hibridación implica un formato de hibridación inversa. En una realización, las sondas están inmovilizadas en ciertas ubicaciones sobre un soporte sólido. En otra realización, las sondas están hibridadas con perlas, en cuyo caso no adoptan una posición fija entre sí.

Lo adecuado es que cualquier ácido nucleico del HPV de una muestra se amplifique según lo descrito anteriormente y que se marquen los ácidos polinucleicos del HPV amplificados para permitir la detección de los híbridos formados.

Según esta realización, se usa al menos una sonda, o un conjunto de al menos 2, preferentemente, al menos 3, más preferentemente, al menos 4 y lo más preferente, al menos 5 sondas. Cuando se usan al menos 2 sondas, dichas sondas se diseñan de modo que se hibriden específicamente con sus secuencias diana en las mismas condiciones de hibridación y las mismas condiciones de lavado.

- 5 En los ensayos de hibridación inversa preferidos, las sondas de oligonucleótido se inmovilizan sobre un soporte sólido en forma de líneas paralelas (Stuyver *et al.*, 1993; solicitud internacional WO 94/12670). El formato de hibridación inversa tiene muchas ventajas prácticas frente a otras técnicas de ADN o formatos de hibridación, especialmente, cuando se prefiere o es inevitable el uso de una combinación de sondas para obtener la información relevante buscada.
- 10 Opcionalmente, cuando es necesario, los procedimientos de detección y tipificación de la presente invención incluyen una etapa de PCR específica de tipo tras la etapa de hibridación, por ejemplo, según lo revelado en el documento WO03014402. La PCR específica de tipo se diseña para amplificar un tipo específico de ácido nucleico del HPV, por ejemplo, ADN de HPV 16 sólo, en comparación con los cebadores inespecíficos, que se pueden usar antes de la tipificación del HPV y que, generalmente, sirven para amplificar ácido nucleico de múltiples tipos de HPV.
- 15 La presente invención también se refiere a cebadores específicos de tipo que son capaces de realizar la amplificación de ácido nucleico de HPV que comprende la región D y/o B del genoma del HPV.

En otra realización, la invención se refiere, por tanto, a un procedimiento que comprende:

1. la amplificación de ácido nucleico de cualquier HPV presente en una muestra biológica;
2. la detección de ácido nucleico de cualquier HPV presente en una muestra biológica;
- 20 3. la tipificación del ácido nucleico del HPV en las muestras, en las que dicho ácido nucleico del HPV se ha detectado poniendo en contacto dicho ácido nucleico con al menos una sonda capaz de hibridarse específicamente con la región B del HPV, estando dicha región indicada en la Figura 1, y luego analizar el tipo de HPV en base al resultado de la hibridación así obtenido; y
- 25 4. opcionalmente, la amplificación y la detección de cualquier ácido nucleico de una muestra usando cebadores específicos de tipo para los tipos no identificados en la etapa 3.

Las etapas 2 y 3 se pueden llevar a cabo simultáneamente.

La presente invención también se refiere a kits para su uso en la presente invención para detectar y/o identificar los tipos de HPV.

- 30 Un kit puede comprender al menos 2 cebadores adecuados para la amplificación del ácido nucleico del genoma del HPV, preferentemente, cebadores capaces de realizar la amplificación de al menos el fragmento 6566-6596 del genoma del HPV, tales como los cebadores dados en las Tablas 1 y 2.

Un kit puede comprender al menos 2 sondas capaces de hibridarse específicamente con el fragmento 6543-6619 del genoma del HPV, siendo la numeración dada con respecto a la Figura 1. Las sondas preferidas son capaces de permitir la diferenciación entre los diferentes tipos de HPV, estando las sondas adecuadas enumeradas en la Tabla 4.

- 35 Un kit puede comprender las instrucciones para llevar a cabo los procedimientos anteriores para el análisis de identificación y tipificación del HPV, en combinación con un cebador y/o una sonda según lo descrito anteriormente.

Un kit puede comprender al menos un cebador y al menos una sonda, según lo ofrecido anteriormente.

Un kit puede comprender una sonda o un cebador de la presente invención inmovilizado sobre un soporte sólido. El soporte puede ser, por ejemplo, una perla, una placa de microtitulación o un portaobjetos.

- 40 Un kit puede comprender una sonda o sondas universales, adecuadamente, una sonda o sondas dadas en la Tabla 3.

La presente invención también se refiere a kits de diagnóstico para la detección y/o la identificación del HPV que pueda estar presente en una muestra biológica, que comprenden los siguientes componentes: (i) al menos un cebador adecuado o al menos un par de cebadores adecuados según lo definido anteriormente; (ii) al menos una sonda adecuada, preferentemente, al menos 2, más preferentemente, al menos 3, incluso más preferentemente, al menos 4 y, lo más preferente, al menos 5 sondas adecuadas, opcionalmente, fijas sobre un soporte sólido.

- 45 Lo adecuado es que el kit comprenda además uno o más de los siguientes elementos:

(iii) un tampón de hibridación o los componentes necesarios para la producción de dicho tampón, o las instrucciones para preparar dicho tampón;

- 50 (iv) una solución de lavado o los componentes necesarios para la producción de dicha solución, o las instrucciones para preparar dicha solución;

(v) un medio para la detección de los híbridos formados;

(vi) un medio para unir la/s sonda/s a una ubicación conocida de un soporte sólido.

Las siguientes definiciones y explicaciones permitirán una mejor comprensión de la presente invención.

5 Los aislados de HPV que presentan una diferencia secuencial de más del 10% con cualquier tipo conocido anteriormente en un fragmento de 291 pb de la región L1 (Chan *et al.*, 1995) se clasifican como "tipos" de HPV diferentes. Los aislados de HPV que difieren entre el 2 y el 10% se clasifican como "subtipos" diferentes. Si la variación secuencial es inferior al 2%, los aislados se clasifican dentro del mismo subtipo como "variantes" diferentes. El término "tipo" cuando se aplica al HPV se refiere a cualquiera de las tres categorías definidas anteriormente.

10 El material diana de las muestras que se van a analizar puede ser bien ADN o ARN, p.ej., ADN genómico, ARN mensajero, ARN viral o versiones amplificadas de los mismos. Estas moléculas también se denominan en la presente solicitud "ácidos nucleicos" o "ácidos polinucleicos".

Existen procedimientos de extracción y purificación ampliamente conocidos para el aislamiento de ARN o ADN de una muestra (p.ej., en Sambrook *et al.*, 1989).

El término "sonda" según la presente invención se refiere, en general, a un oligonucleótido monocatenario que está diseñado para que se hibride específicamente con los ácidos polinucleicos del HPV.

15 El término "cebador" se refiere, en general, a una secuencia de oligonucleótido monocatenario capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de un producto de extensión de cebador que sea complementario a la cadena de ácido nucleico que se vaya a copiar. La longitud y la secuencia del cebador deben ser tales que permitan el inicio de la síntesis de los productos de la extensión.

20 Preferentemente, el cebador tiene una longitud de aproximadamente 10-50 nucleótidos. La longitud específica y la secuencia dependerán de la complejidad de las dianas de ADN o ARN requeridas, así como de las condiciones en las que se use el cebador, tales como la temperatura y la fuerza iónica.

La expresión "par de cebadores" o "par de cebadores adecuado" en la presente se refiere a un par de cebadores que permite la amplificación de parte o todo el fragmento de ácido polinucleico del HPV para el que las sondas son capaces de unirse.

25 El término "diana" o la expresión "secuencia diana" de una sonda o de un cebador según la presente invención es una secuencia de los ácidos polinucleicos del HPV con respecto a la cual la sonda o el cebador es completamente complementario/a o parcialmente complementario/a (donde parcialmente complementario/a implica cierto grado de apareamiento erróneo). Se entenderá que el complemento de dicha secuencia diana también es una secuencia diana adecuada en algunos casos. Las sondas de la presente invención son adecuadamente complementarias a, al menos, la parte central de su secuencia diana. En la mayoría de los casos, las sondas son completamente complementarias a su secuencia diana. La expresión "secuencia diana específica de un tipo" se refiere a una secuencia diana de los ácidos polinucleicos de un tipo de HPV dado que contiene al menos la diferencia de un nucleótido en comparación con cualquier otro tipo de HPV.

35 "Hibridación específica" de una sonda con una región de los ácidos polinucleicos del HPV significa que dicha sonda forma un dúplex con parte de esta región o con la región entera en las condiciones experimentales usadas y que en estas condiciones, dicha sonda no forma un dúplex con otras regiones de los ácidos polinucleicos presentes en la muestra que se vaya a analizar. Se debería entender que las sondas diseñadas para hibridarse específicamente con una región de ácido polinucleico del HPV pueden pertenecer completamente a dicha región o pueden solaparse en gran medida con dicha región (i.e., formar un dúplex con nucleótidos fuera, así como dentro de dicha región).

40 Lo adecuado es que la hibridación específica de una sonda con una región diana de ácido nucleico tenga lugar en condiciones de hibridación rigurosas, tales como 3 x SSC, SDS al 0,1% a 50°C.

45 Los expertos en la técnica saben cómo variar los parámetros de temperatura, longitud de sonda y concentración salina para que se pueda conseguir una hibridación específica. Las condiciones de hibridación y lavado son ampliamente conocidas y se ejemplifican en Sambrook, *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Segunda edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), concretamente, Capítulo 11 del mismo. Cuando es necesario, se pueden hacer ligeras modificaciones de las sondas en cuanto a su longitud o secuencia para mantener la especificidad y la sensibilidad necesarias en las circunstancias dadas. Las sondas y/o los cebadores enumerados en la presente memoria se pueden ampliar en 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos, por ejemplo, en cualquier sentido (secuencia arriba o secuencia abajo de la región D).

50 Lo adecuado es que las condiciones rigurosas preferidas sean aquéllas que permitan a una sonda específica de tipo unirse a un solo tipo de HPV. Así pues, en una realización de la invención, el procedimiento para tipificar cualquier ácido nucleico del HPV que pueda estar presente en una muestra biológica comprende las etapas de poner en contacto cualquiera de dichos ácidos nucleicos con al menos una sonda que sea capaz de hibridarse con la región D y/o B del HPV en condiciones rigurosas.

- Las sondas que se hibridan específicamente con las regiones D y/o B del genoma del HPV según lo definido en la presente memoria son adecuadamente al menos un 95% complementarias a la secuencia diana en su longitud, adecuadamente, más del 95% idénticas, tal como el 96%, 97%, 98%, 99% y, lo más preferente, el 100% complementarias en su longitud a la secuencia del HPV diana. Las sondas de la invención pueden ser complementarias a su secuencia diana en todas las posiciones de los nucleótidos, siendo posiblemente tolerados 1, 2 o más apareamientos erróneos en función de la longitud de la sonda, la temperatura, las condiciones de reacción y los requisitos del ensayo, por ejemplo.
- Lo adecuado es que cada nucleótido de la sonda pueda formar un enlace de hidrógeno con su nucleótido diana homólogo.
- Preferentemente, la complementariedad de la sonda con la diana se analiza mediante el grado de apareamiento de las bases A:T y C:G, de modo que un nucleótido de adenina se aparee con una timina y de modo que un nucleótido de guanina se aparee con una citosina, o viceversa. En la forma de ARN, T se puede reemplazar por U (uracilo).
- Cuando se usa inosina en las sondas universales, por ejemplo, o en cebadores, la complementariedad también se puede analizar mediante el grado de interacciones entre la inosina (sonda) y el nucleótido diana.
- Como tal, también se puede ver que la presente invención se refiere a un procedimiento para la detección y/o la tipificación de cualquier ácido nucleico del HPV que pueda estar presente en una muestra biológica, procedimiento que comprende las etapas de poner en contacto cualquiera de dichos ácidos nucleicos con al menos una sonda, teniendo la sonda 1 ó 0 apareamientos erróneos de nucleótidos a lo largo de la región B de un genoma del HPV, estando dicha región indicada en la Figura 1, y luego analizar el tipo de HPV en base al resultado de hibridación así obtenido.
- “Hibridación específica” de un cebador con una región de los ácidos polinucleicos del HPV significa que, durante la etapa de amplificación, dicho cebador forma un dúplex con parte de esta región o con la región entera en las condiciones experimentales usadas y que en estas condiciones, dicho cebador no forma un dúplex con otras regiones de los ácidos polinucleicos presentes en la muestra que se vaya a analizar. Se debería entender que los cebadores que se diseñan para hibridarse específicamente con una región de ácidos polinucleicos del HPV pueden pertenecer a dicha región o pueden solaparse en gran medida con dicha región (i.e., formar un dúplex con nucleótidos fuera, así como dentro de dicha región).
- Una realización de la presente invención requiere la detección de apareamientos erróneos de un solo par de bases, prefiriéndose condiciones rigurosas para la hibridación de las sondas que únicamente permitan la hibridación de secuencias exactamente complementarias. En cualquiera caso, debería señalarse que, como la parte central de la sonda es esencial para sus características de hibridación, se pueden permitir posibles desviaciones de la secuencia de la sonda frente a la secuencia diana hacia los extremos de la sonda cuando se usan secuencias de sondas más largas. Son posibles las variaciones en la longitud de las sondas.
- Dichas desviaciones y variaciones, que se pueden concebir desde el conocimiento común en la técnica, sin embargo, siempre han de evaluarse experimentalmente para comprobar si producen características de hibridación equivalentes como sondas exactamente complementarias.
- Preferentemente, las sondas de la invención tienen una longitud de aproximadamente 5 a 50 nucleótidos, más preferentemente, de aproximadamente 10 a 25 nucleótidos. Las longitudes de sondas particularmente preferidas incluyen 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos (sin contar ninguna secuencia espaciadora que pueda estar presente). Los nucleótidos como se usan en la presente invención pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y nucleótidos modificados, tales como inosina o nucleótidos que contienen grupos modificados que no alteran esencialmente sus características de hibridación.
- Las secuencias de las sondas se representan en la memoria como oligonucleótidos de ADN monocatenario del extremo 5' al extremo 3'. Es evidente para el experto en la técnica que se puede usar cualquiera de las sondas especificadas más adelante como tales, o en su forma complementaria, o en su forma de ARN (cuando T está reemplazada por U).
- Las sondas según la invención se pueden preparar mediante la clonación de plásmidos recombinantes que contienen insertos que incluyen las correspondientes secuencias de nucleótidos, si fuera necesario, mediante la escisión del último de los plásmidos clonados mediante el uso de las nucleasas adecuadas y su recuperación, p. ej., mediante el fraccionamiento según el peso molecular. Las sondas según la presente invención también se pueden sintetizar químicamente, por ejemplo, mediante el procedimiento de fosfo-triéster convencional.
- El hecho de que los cebadores de la amplificación no tengan que coincidir exactamente con la secuencia diana correspondiente en el molde para garantizar una amplificación apropiada está ampliamente documentado en la bibliografía (Kwok *et al.*, 1990). Sin embargo, cuando los cebadores no son completamente complementarios con su secuencia diana, se debería tener en cuenta que los fragmentos amplificados tendrán la secuencia de los cebadores y no la de la secuencia diana.
- Los cebadores se pueden marcar con el marcador de elección (p. ej., biotina). El procedimiento de amplificación usado

5 puede ser bien la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki *et al.*, 1988), la reacción en cadena de la ligasa (LCR; Landgren *et al.*, 1988; Wu & Wallace, 1989; Barany, 1991), la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA; Guatelli *et al.*, 1990; Compton, 1991), el sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS; Kwoh *et al.*, 1989), la amplificación de desplazamiento de cadenas (SDA; Walker *et al.*, 1992) o la amplificación por medio de la replicasa QB (Lomeli *et al.*, 1989) o cualquier otro procedimiento adecuado para amplificar moléculas de ácido nucleico que se conozca en la técnica.

10 Los oligonucleótidos usados como cebadores o sondas también pueden comprender análogos de nucleótidos, tales como fosforotiatos (Matsukura *et al.*, 1987), alquilfosforotiatos o ácidos nucleicos peptídicos (Egholm M., Buchardt O., Christensen L., Behrens C., Freier S. M., Driver D. A., Berg R. H., Kim S. K., Norden B., Nielsen P. E., "PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules". *Nature.*, 7 de octubre de 1993; 365(6446):566-8) o pueden contener agentes de intercalación (Asseline *et al.*, 1984). Como la mayoría de otras variaciones o modificaciones introducidas en las secuencias de ADN originales de la invención, estas variaciones necesitarán adaptaciones con respecto a las condiciones bajo las que se debería usar el oligonucleótido para obtener la especificidad y la sensibilidad necesarias. Sin embargo, los resultados finales de hibridación serán esencialmente 15 los mismos a los obtenidos con los oligonucleótidos no modificados. La introducción de estas modificaciones puede ser ventajosa para influir positivamente en las características, tales como las cinéticas de hibridación, la reversibilidad de la formación de híbridos, la estabilidad biológica de las moléculas de oligonucleótido, etc.

20 La expresión "soporte sólido" puede referirse a cualquier sustrato al que la sonda de oligonucleótido se pueda acoplar, con la condición de que mantenga sus características de hibridación y con la condición de que el nivel de fondo de la hibridación permanezca bajo. Habitualmente, el sustrato sólido será una placa de microtitulación (p. ej., en la técnica de DEIA), una membrana (p. ej., nailon o nitrocelulosa) o una microesfera (perla) o un chip. Antes de la aplicación a la membrana o la fijación, puede ser conveniente modificar la sonda de ácido nucleico para facilitar la fijación o mejorar la eficacia de la hibridación. Dichas modificaciones pueden englobar la adición de una cola de homopolímeros, el acoplamiento con diferentes grupos reactivos, tales como grupos alifáticos, grupos NH<sub>2</sub>, grupos SH, grupos 25 carboxílicos o el acoplamiento con biotina, haptenos o proteínas.

Según lo tratado anteriormente, la hibridación puede tener lugar en un medio líquido y la unión de la sonda con la diana se puede analizar, por ejemplo, mediante citometría de flujo.

30 El término "marcado/a" se refiere en general al uso de ácidos nucleicos marcados. El marcaje se puede llevar a cabo mediante el uso de nucleótidos marcados incorporados durante la etapa de la amplificación mediante polimerasas, tales como los ilustrados por Saiki *et al.* (1988) o Bej *et al.* (1990), o cebadores marcados, o mediante cualquier otro procedimiento conocido por el experto en la técnica. La naturaleza del marcador puede ser isotópica ("P", "S, etc.) o no isotópica (biotina, digoxigenina, etc.).

35 La "muestra" puede ser cualquier material que pueda contener ácido nucleico del HPV, tal como un material biológico, por ejemplo, tomado bien directamente de un ser humano (o un animal) o tras el cultivo (enriquecimiento), o puede ser ácido nucleico del HPV recombinante expresado en una célula huésped. El material biológico puede ser, p. ej., orina, o raspados/biopsias del tracto urogenital o de cualquier parte del cuerpo humano o animal.

Los conjuntos de sondas de la presente invención incluirán generalmente al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más sondas.

40 Dichas sondas se pueden aplicar en dos o más (posiblemente, en tantas como sondas haya) posiciones distintas y conocidas sobre un sustrato sólido. Habitualmente, es preferible aplicar dos o más sondas o conjuntamente en una y la misma posición de dicho soporte sólido. La invención se refiere a un soporte sólido unido a 1 o más sondas de la presente invención.

45 Para diseñar las sondas con las características deseadas, se pueden aplicar las siguientes directrices útiles conocidas por el experto en la técnica.

Debido a que el grado y la especificidad de las reacciones de hibridación tales como aquéllas descritas en la presente memoria se ven afectados por una serie de factores, la manipulación de uno o más de esos factores determinará la sensibilidad y la especificidad exactas de una determinada sonda, ya sea perfectamente complementaria a su diana o no. En la presente memoria, se explica más detalladamente la importancia y el efecto de las diversas condiciones del 50 ensayo.

La estabilidad del híbrido de ácido nucleico [diana:sonda] se ha de seleccionar para que sea compatible con las condiciones del ensayo. Esto se puede realizar evitando largas secuencias ricas en AT, terminando los híbridos con pares de bases G:C y diseñando la sonda con una Tm apropiada. El punto inicial y el punto final de la sonda se han de seleccionar para que la longitud y el % de G-C se obtengan en una Tm de aproximadamente 2°C más que la temperatura a la que se realice el ensayo final. La composición de bases de la sonda es relevante, porque los pares de bases G-C presentan mayor estabilidad térmica en comparación con los pares de bases A-T debido al puente de hidrógeno adicional. Así pues, la hibridación en la que participan ácidos nucleicos complementarios de mayor contenido de G-C será más estable a mayores temperaturas.

Las condiciones tales como la fuerza iónica y la temperatura de incubación en las que se vaya a usar una sonda también se han de tener en cuenta cuando se diseña una sonda. Se sabe que el grado de hibridación aumentará a medida que aumente la fuerza iónica de la mezcla de reacción y que la estabilidad térmica de los híbridos aumentará al aumentar la fuerza iónica. Por otro lado, los reactivos químicos, tales como la formamida, urea, DMSO y alcoholes, que interrumpen los enlaces de hidrógeno aumentarán el carácter riguroso de la hibridación. La desestabilización de los enlaces de hidrógeno de dichos reactivos pueden reducir enormemente la T<sub>m</sub>. En general, la hibridación óptima para las sondas de oligonucleótido sintéticas de aproximadamente 10-50 bases de longitud tiene lugar aproximadamente 5°C por debajo de la temperatura de fusión para un dúplex dado. La incubación a temperaturas por debajo de la óptima puede permitir la hibridación de las secuencias de bases apareadas erróneamente y puede, por tanto, reducir la especificidad.

Es deseable tener sondas que sólo se hibriden en condiciones muy rigurosas. En condiciones muy rigurosas sólo se formaran híbridos de ácidos nucleicos muy complementarios; no se formarán híbridos sin un suficiente grado de complementariedad. Por consiguiente, la rigurosidad de las condiciones del ensayo determina la cantidad de complementariedad necesaria entre dos cadenas de ácido nucleico que forman un híbrido. El grado de rigurosidad se selecciona para maximizar la diferencia de estabilidad entre el híbrido formado con el ácido nucleico diana y el ácido nucleico no diana. En el caso que nos ocupa, es necesario detectar cambios de un par de bases, lo que requiere condiciones de una rigurosidad muy elevada.

La longitud de la secuencia de la sonda también puede ser importante. En algunos casos, puede haber varias secuencias de una determinada región, de ubicación y longitud variable, que produzcan sondas con las características de hibridación deseadas. En otros casos, una secuencia puede ser significativamente mejor que otra que difiera simplemente en una sola base. Aunque es posible la hibridación de ácidos nucleicos que no sean perfectamente complementarios, el tramo más largo de la secuencia de bases perfectamente complementaria normalmente determinará fundamentalmente la estabilidad del híbrido.

Aunque se pueden usar sondas de oligonucleótido de diferentes longitudes y composición de bases, las sondas de oligonucleótido de la presente invención tienen una longitud de entre aproximadamente 5 a 50 (más particularmente, de 10-25) bases y tienen un tramo suficiente en la secuencia que es perfectamente complementario a la secuencia de ácido nucleico diana.

Se prefieren en menor medida las regiones del ADN o el ARN diana que se sabe que forman potentes estructuras internas inhibitorias de la hibridación. Asimismo, se deberían evitar las sondas con una amplia auto-complementariedad. Como se explica anteriormente, la hibridación es la asociación de dos cadenas sencillas de ácidos nucleicos complementarios para formar una cadena doble unida mediante hidrógeno.

Está implícito que si una de las dos cadenas está completa o parcialmente implicada en un híbrido, ésta será menos capaz de participar en la formación de un nuevo híbrido. Pueden existir híbridos intramoleculares e intermoleculares formados en las moléculas de un tipo de sonda si hay suficiente auto-complementariedad. Dichas estructuras se pueden evitar mediante un cuidadoso diseño de la sonda. Mediante el diseño de una sonda de modo que una parte sustancial de la secuencia de interés sea monocatenaria, se puede aumentar enormemente la velocidad y el grado de hibridación. Los programas informáticos pueden buscar este tipo de interacción. Sin embargo, en ciertos casos, puede que no sea posible evitar este tipo de interacción.

Para identificar diferentes tipos de HPV con el conjunto de sondas de oligonucleótido seleccionado, se puede usar cualquier procedimiento de hibridación conocido en la técnica (transferencia de puntos convencional, transferencia Southern, sándwich, etc.). Sin embargo, para obtener resultados de manera rápida y fácil cuando hay una multitud de sondas implicada, puede ser más conveniente un formato de hibridación inversa. En una realización preferida, las sondas seleccionadas se inmovilizan sobre un soporte sólido en distintas ubicaciones conocidas (puntos, líneas u otras figuras). En otra realización preferida, el conjunto de sondas seleccionado se inmoviliza en una tira membranosas de una manera lineal. Dichas sondas se pueden inmovilizar individualmente o como mezclas en ubicaciones delimitadas en el soporte sólido. En el Ejemplo 4 del documento WO9914377, se revela una realización específica y de fácil uso del procedimiento preferido anteriormente mencionado, que se puede adaptar a la presente invención. Se pueden marcar con biotina los ácidos polinucleicos del HPV y luego se puede detectar el híbrido, mediante un acoplamiento con biotina-estreptavidina, con un sistema de coloración no radiactivo.

La expresión "tampón de hibridación" significa un tampón que permite una reacción de hibridación entre las sondas y los ácidos polinucleicos presentes en la muestra, o los productos amplificados, en condiciones rigurosas apropiadas.

La expresión "solución de lavado" significa una solución que permite el lavado de los híbridos formados en las condiciones rigurosas apropiadas.

A lo largo de la presente memoria y de las reivindicaciones que la siguen, a no ser que el contexto indique lo contrario, se entenderá que la palabra "comprende", o las variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implican la inclusión de un número entero o una etapa establecidos, o de un grupo de números enteros o de etapas establecidos, pero sin la exclusión de ningún otro número entero ni etapa, ni de un grupo de números enteros o de etapas. "Que comprende" también implica la inclusión de los significados "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

Las realizaciones de la invención incluyen:

- (a) Un procedimiento para la tipificación de cualquier ácido nucleico del HPV que pueda estar presente en una muestra, procedimiento que comprende las etapas de:
- 5 (ii) poner en contacto cualquier ácido nucleico con al menos una sonda capaz de hibridarse específicamente con la región B del genoma del HPV, estando dicha región B indicada en la Figura 1, y
- (ii) analizar el tipo de HPV en base al resultado de la hibridación así obtenido.
- b) Un procedimiento según el enunciado (a), en el que la sonda es capaz de hibridarse específicamente con la región B del genoma de un solo tipo de HPV.
- 10 c) Un procedimiento según el enunciado (a), en el que la sonda se selecciona de la enumeración que consiste en las secuencias enumeradas en la Tabla 4.
- d) Un procedimiento según cualquier enunciado anterior, en el que cualquier ácido nucleico del HPV presente en la muestra se amplifica antes de la hibridación.
- 15 (e) un procedimiento según el enunciado (e) en el que la etapa de amplificación usa un cebador seleccionado de la enumeración que comprende: HPV-MPF1F1, HPV-MPF1F2, HPV-MPF1F3, HPV-MPF1F4, HPV-MPF1F5, HPV-MPF1F6, HPV-MPF1F7, HPV-MPF1F8, HPV-MPF1F9, HPV-MPF1F10, HPV-MPF2R1, HPV-MPF2R2, HPV-MPF2R3, HPV-MPF2R4, HPV-MPF2R5, HPV-MPF2R6, HPV-MPF2R7, HPV-MPF2R8.
- (f) un procedimiento según cualquier enunciado anterior en el que la presencia del ácido nucleico del HPV se confirma en la muestra antes de la etapa de tipificación.
- 20 (g) Un procedimiento según cualquier enunciado anterior en el que la hibridación entre la sonda y la diana se lleva a cabo en presencia de un soporte sólido.
- (h) Un procedimiento según el enunciado (h) en el que la etapa de hibridación usa un formato de hibridación inversa.
- (i) Un procedimiento según el enunciado (h), en el que la sonda se hibrida sobre una perla.
- (j) Un procedimiento según el enunciado (j), en el que la detección de la hibridación se analiza usando una citometría de flujo.
- 25 (k) Un kit que comprende al menos 2 cebadores adecuados para la amplificación de ácido nucleico de la región B o D de un genoma del HPV.
- 30 (l) Un kit según el enunciado (l), en el que los cebadores se seleccionan de la enumeración que consiste en HPV-MPF1F1, HPV-MPF1F2, HPV-MPF1F3, HPV-MPF1F4, HPV-MPF1F5, HPV-MPF1F6, HPV-MPF1F7, HPV-MPF1F8, HPV-MPF1F9, HPV-MPF1F10, HPV-MPF2R1, HPV-MPF2R2, HPV-MPF2R3, HPV-MPF2R4, HPV-MPF2R5, HPV-MPF2R6, HPV-MPF2R7 y HPV-MPF2R8.
- (m) Un kit que comprende al menos 2 sondas capaces de hibridarse específicamente con la región D o la región B del genoma del HPV.
- (n) Un kit según el enunciado (n), en el que las sondas son dos sondas cualquiera seleccionadas de la Tabla 4.
- 35 (o) Un kit que comprende cualquier cebador de la Tabla 1 ó 2, o cualquier sonda de la Tabla 3 e instrucciones para llevar a cabo los procedimientos anteriores para el análisis de identificación y tipificación del HPV.
- (p) Un kit que comprende una sonda capaz de hibridarse específicamente con la región D o la región B del genoma del HPV unida a un soporte sólido.
- (q) Un kit según cualquier enunciado (l)-(q) que comprende además cualquier sonda de la Tabla 3.
- 40 (r) Una sonda adecuada para su uso en el procedimiento de el enunciado A, siendo la sonda seleccionada de la Tabla 4.
- (s) Una cebador adecuado para su uso en el procedimiento de el enunciado (e), siendo la sonda seleccionada de las Tablas 1 y 2.

#### Referencias

- 45 Baay, M.F.D., W.G.V. Quint, J. Koudstaal, H. Hollema, J. M. Duk, M. P. M. Burger, E. Stolz y P. Herbrink. 1995. "Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas". 34:745-747.

- Claas, E. C. J., W. J. G. Melchers, H. C. van der Linden, J. Lindeman y W. G. V. Quint. 1989. "Human papillomavirus detection in paraffin embedded cervical carcinomas and metastases of the carcinomas by the polymerase chain reaction". *Am. J. Pathol.* 135:703709.
- 5 Cornelissen, M. T. E., J. G. van den Tweel, A. P. H. B. Struyk, M. F. Jebbink, M. Bri&, J. van der Noordaa y J. ter schegget. 1989. "Localization of human pappilomavirus type 16 DNA using the polymerase chain reaction in the cervix uteri of women with cervical intraepithelial neoplasia". *J. Gen. Virol.* 70:2555-2562.
- Cox, J. Th., A. T. Lorincz, M. H. Schiffman, M. E. Sherman, A. Cullen y R. J. Kurman. "Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance". *Am. J. Obstet Gynecol*, 1995; 164: 1461-1471.
- 10 Falcinelli, C., E. Claas, B. Kleter y W. G. V. Quint. 1992. "Detection of the human papillomavirus type 16 mRNA-transcripts in cytological abnormal scrappings". *J. Med. Virol.* 37:93-98.
- Manos, M. M., Y. Ting, D. K. Wright, A. J. Lewis, T. R. Broker y S. M. Wolinsky. 1989. "The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses". *Cancer Cells* 7:209-214.
- 15 Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis y H. A. Erlich. 1988. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". *Science*, 239:487- 49 1.
- Sambrook *et al.* 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", II edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Stuyver, L., R. Rossau, A. Wyseur, M. Duhamel, B. Vanderborght, H. Van Heuverswyn y G. Maertens. 1993. "Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay". *J. Gen. Virol.* 74:1093-1102.
- 20 Tieben L. M., J. ter Schegget, R. P. Minnaar, J. N. Bouwes Bavinck, RIM. Berkhout, B. J. Vermeer, M. f Jebbink y H. L. Smits. 1993. "Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers". *J. Virol. Methods* 42:265-280.
- Van den Brule, A. J. C., P. J. F. Snijders, R. L. J. Gordijn, O. P. Bleker, C. J. L. M. Meijer y J. M. M. Walboomers. 1990. "General primer-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas". *Int. J. Cancer* 45:644-649.
- 25 Young, L. S., I. S. Bevan, M. A. Johnson, P. I. Blomfield, T. Bromidge, N. J. Maitland y G. B. J. Woodman. 1989. "The polymerase chain reaction: A new epidemiological tool for investigatgfnig cervical human papillomavirus infection". *Brit. Med. J.* 298:14-18.
- Woodworth, C.D., Waggoner, S., Bames, W., Stoler, M. H., Di Paolo, J. A. 1990. "Human cervical and foreskin epithelial cells immortalized by human papillomavirus DNAs exhibit displastic differentiation in vivo". *Cancer Res.* 50: 3709-3715.
- 30 Kwok S., Kellogg D. E., McKinney N., Spasic D., Goda L., Levenson C., Sninsky J. J. "Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies". *Nucleic Acids Res.* 1990, 25;18 (4):999-1005.
- 35 Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". *Science* 1988, 29;239(4839):487-491.
- Wu D. Y., Wallace R. B., "The ligation amplification reaction (LAR)--amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation", *Genomics* 1989, 4(4):560-569.
- Barany F., "The ligase chain reaction on a PCR world". *PCR Methods Appl.* 1991, 1(1):5-16.
- Errata en: *PCR Methods Appl.* 1991, 1(2):149.
- 40 Guatelli J. C., Whitfield K. M., Kwoh D. Y., Barringer K. J., Richman D. D., Gingeras T. R. "Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modelled after retroviral replication". *Proc Natl Acad Sci, EE.UU.*, 1990, 87(5): 1874-1878.
- Errata en: *Proc Natl Acad Sci, EE.UU.*, 1990 87(19):7797.
- Compton J Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 1991, 7; 350(6313):91-92
- 45 Kwoh D. Y., David G. R., Whitfield K. M., Chappelle H. L., DiMichele L. J., Gingeras T. R., "Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format". *Proc Natl Acad Sci, EE.UU.* 1989, 86(4):1173-1177.
- Walker G. T., Fraiser M. S., Schram J. L., Little M. C., Nadeau J. G., Malinoswi D. P., "Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique". *Nucleic Acids Res.* 1992 11;20(7): 1691-1696.

- Lomeli H., Tyagi S., Pritchard C. G., Lizardi P. M., Kramer, "FRQuantitative assays based on the use of replicatable hybridization probes". *Clin Chem* 1989, 35(9):1826-1831.
- 5 Matsukura M., Shinozuka K., Zon G., Mitsuya H., Reitz M., Cohen J. S., "Broder SPhosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus". *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU. 1987, 84(21):7706-7710.
- Asseline U., Delarue M., Lancelot G., Toulme F., Thuong N. T., Montenay-Garestier T., Helene C., "Nucleic acid-binding molecules with high affinity and base sequence specificity: intercalating agents covalently linked to oligodeoxynucleotides". *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU. 1984, 81(11):3297-3301.
- 10 Bej A. K., Steffan R. J., DiCesare J., Haff L., "Atlas RMDetection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes". *Appl Environ Microbiol*. 1990, 56(2):307-314.
- Bej A. K., Mahbubani M. H., Miller R., DiCesare J. L., HaffL, "Atlas RMMultiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water". *Mol Cell Probes* 1990, 4(5):353-365.
- 15 Remmink A. J., Walboomers J. M., Helmerhorst T. J., Voorhorst F. J., Rozendaal L., Risse E. K., Meier C. J., Kenemans P. "persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months". *Int J Cancer*., 4 de mayo de 1995; 61(3):306-11.
- Chan S.Y., Delius H., Halpern A. L., Bernard H. U. "Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy". *J Virol*., mayo de 1995; 69(5):3074-83.
- de Villiers E. M., Fauquet C., Broker T. R., Bernard H. U., zur Hausen H. "Classification of papillomaviruses". *Virology*. 20 de junio de 2004; 324(1):17-27.
- 20 Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. "Basic local alignment search tool". *J Mol Biol*. 5 de oct. de 1990; 215 (3):403-10.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res*. 1 de septiembre de 1997; 25(17):3389-402.
- 25 Zella D., Cavicchini A., Cattaneo E., Cimarelli A., Bertazzoni U. "Utilization of a DNA enzyme immunoassay for the detection of proviral DNA of human immunodeficiency virus type 1 by polymerase chain reaction". *Clin Diagn Virol*., febrero de 1995; 3(2):155-64.

### Ejemplo 1

El siguiente enfoque se puede usar para tipificar el ADN del HPV.

#### 30 Composición de la mezcla de PCR (amplificación del ADN del HPV de la muestra)

Componente	µl por reacción
10 x tampón de PCR	5
Varios dNTP 1mM	10
MgCl <sub>2</sub> 25mM	5
20 pmol/µl de cebador directo	1
20 pmol/µl de cebador inverso	1
AmpliTaq Gold (5U/µl)	0,3
Agua	17,7
Volumen total	40

Se añaden 10 µl de ADN diana formando un volumen final de 50 µl.

**Cebadores universales que se van a usar**

HPV-MPF1F1 (10 pmol/μl)
HPV-MPF1F2 (10 pmol/μl)
HPV-MPF1F3 (10 pmol/μl)
HPV-MPF1F4 (10 pmol/μl)
HPV-MPF1F5 (10 pmol/μl)
HPV-MPF1F6 (10 pmol/μl)
HPV-MPF1F7 (10 pmol/μl)
HPV-MPF1F8 (10 pmol/μl)
HPV-MPF1F9 (10 pmol/μl)
HPV-MPF1F10 (10 pmol/μl)
HPV-MPF2R1-bio (10 pmol/μl)
HPV-MPF2R2-bio (10 pmol/μl)
HPV-MPF2R3-bio (10 pmol/μl)
HPV-MPF2R4-bio (10 pmol/μl)
HPV-MPF2R5-bio (10 pmol/μl)
HPV-MPF2R6-bio (10 pmol/μl)
HPV-MPF2R7-bio (10 pmol/μl)
HPV-MPF2R8-bio (10 pmol/μl)

**Programa de la PCR**

5 9 min a 94°C, activación de 40 ciclos de AmpliTaq Gold que comprenden:

- 30 s a 94°C
- 45 s a 52°C
- 45 s a 72°C.

Incubación final de 5 min a 72°C.

10 Para la PCR múltiplex (conjunto de MPF completo), se han usado los siguientes plásmidos que contienen ADN genómico del HPV:

- HPV 16
- HPV 18
- HPV31
- 15 - HPV33
- HPV45
- HPV52
- HPV56
- HPV66
- 20 - HPV35
- HPV67
- HPV11
- HPV26
- HPV53
- 25 - HPV58
- HPV71

- HPV13
- HPV39
- HPV54
- HPV69
- 5 - HPV70
- HPV74
- HPV7

Todos produjeron un fragmento del tamaño esperado.

10 Para la PCR simple (directa simple + inversa simple), se han usado los siguientes plásmidos que contienen ADN genómico del HPV:

- HPV16
- HPV35
- HPV59
- HPV18
- 15 - HPV56
- HPV68
- HPV39
- HPV33
- HPV6
- 20 - HPV51
- HPV26
- HPV40
- HPV43

Todos produjeron un fragmento del tamaño esperado.

25 **Ejemplo de un producto de PCR usando cebadores de PCR simples (véase la Figura 3)**

- Carril 1: marcador
- Carril 2: HPV18
- Carril 3: HPV56
- Carril 4: HPV39
- 30 Carril 5: HPV26
- Carril 6: HPV43
- Carril 7: HPV33

**PCR múltiplex sobre gel (véase la Fig. 4)**

- Carril 1: marcador
- 35 Carril 2: HPV16
- Carril 3: HPV18
- Carril 4: HPV31
- Carril 5: HPV33
- Carril 6: HPV45
- 40 Carril 7: HPV52
- Carril 8: HPV56
- Carril 9: marcador

**Condiciones de la hibridación inversa (ensayo de sonda lineal)**

45 Se pueden hibridar 10 µl de un producto de PCR con una tira que contenga alguna de las sondas seleccionadas. Las condiciones adecuadas que se usarán serán las siguientes:

Perfil de hibridación inversa:

Etapa	Temperatura	Tiempo de incubación
Desnaturalización	Temp. ambiente	10 min
Hibridación	50°C	60 min
Lavado riguroso	50°C	30 min
Conjugado	Temp. ambiente	30 min
Sustrato	Temp. ambiente	30 min

La hibridación se lleva a cabo adecuadamente a 3 x SSC, SDS al 0,1%, 50°C. Se obtuvieron los resultados de la Figura 5.

**TABLAS**

5 **Conjunto general de cebadores**

**Tabla 1. Cebadores directos (MPF directos)**

Nombre	Secuencia 5' → 3'	SEC ID N.º:
HPV-MPF1F1	GATGCCCAAATATTCAATAAACC	1
HPV-MPF1F2	GATGCICAAATATTTAATAAACC	2
HPV-MPF1F3	GAITCICAATTATTTAATAAACC	3
HPV-MPF1F4	GAIGCICAGTTGTTTAATAAAC C	4
HPV-MPF1F5	GATTCICAATTGTTTAACAAACC	5
HPV-MPF1F6	GAITCICAGTTATTTAACAAGCC	6
HPV-MPF1F7	GAITCICAGTTATTTAATAAGCC	7
HPV-MPF1F8	GAIGCICAATTGTTTAATAAGCC	8
HPV-MPF1F9	GAITCICAATTATTTAATAAGCC	9
HPV-MPF1F10	GATTCTCAAATTTTAATAAGCC	10

**Tabla 2. Cebadores inversos (MPF inversos)**

Nombre	Secuencia 5' → 3'	SEC ID N.º:
HPV-MPF2R1	TTICCCAICAAATGCCATT	11
HPV-MPF2R2	TTITCCAICAAATGCCATT	12
HPV-MPF2R3	TTICCAAACAAATGCCATT	13
HPV-MPF2R4	TCATTAACCAACAAATGCCATT	14
HPV-MPF2R5	TGATTAAACCAICAAATACCATT	15
HPV-MPF2R6	TTATGCCAGCAAACACCATT	16
HPV-MPF2R7	TGATTATGCCAACAIATACCATT	17
HPV-MPF2R8	TTICCCAACAIATACCATT	18

**Sondas universales para la detección general de amplímeros de MPF****Tabla 3. Sondas para DEIA**

Nombre de la sonda	Secuencia 5' → 3'	Posición inicial en la Figura 1	SEC ID N.º:
HPV MPF P1	AAGCCITAITGGCTGCA	19	19
HPV MPF P1-2	AAIAAGCCITAITGGCTGCA	16	20
HPV MPF P1-3	TTTAAIAAGCCITAITGGCTGCA	13	21
HPV MPF P2	TGGATICAAAAIGCCCAGG	28	22
HPV MPF P2-2	TGGATICAAAAIGCCCAGGG	28	23
HPV MPF P3	TTTAATAAACCATATTGGITGCAA	13	24
HPV MPF P4	TTTAATAAACCATATTGGTTACA	13	25
HPV MPF P5	TTTAATAAICCTTATTGGTTGCA	13	26
HPV MPF P6	TTTAATAAGCCITAITGGTTACA	13	27
HPV MPF P6-2	TTTAATAAGCCITAITGGTTACAA	13	28
HPV MPF P7	AATAAGCCITATTGGCTACA	16	29
HPV MPF P7-2	TTTAATAAGCCITATTGGCTACA	13	30
HPV MPF P8	AATAAACCTTATTGGTTACAACGA	16	31

**Tabla 4 – Sondas específicas de tipo. Secuencia 5'→ 3 de las sondas específicas de tipo**

Nombre de la sonda	Secuencia 5' → 3'	Polaridad	Posición inicial en la Figura 1	Longitud	SEC ID N.º:
11L1nPr1	GGCTTCAAAAGGCTCAG	+	29	17	32
13L1nPr1	ATTGGTTACAAAAGGCC	+	26	17	33
13L1nPr2	TGGTTACAAAAGGCC	+	28	16	34
16L1nPr1	TTATTGGTTACAACGAGCA	+	24	19	35
16L1nPr2	TTATTGGTTACAACGAGC	+	24	18	36
16L1nPr3	CTTATTGGTTACAACGAG	+	23	18	37
18L1nPr1	AGGCACAGGGTCATAAC	+	38	17	38
18L1nPr2	AGGCACAGGGTCATAAg	+	38	17	39
18L1nPr3	AAGGCACAGGGTCATAAg	+	37	18	40
18L1nPr4	GTTACATAAGGCACAGG	+	30	17	41
26L1nPr1	GTGCACAGGGTCATAAT	+	38	17	42
26L1nPr2	TGGTTACAACGTGCACA	+	28	17	43
30L1nPr1	TACTGGTTGCAACGCG	+	25	16	44
30L1nPr2	TTACTGGTTGCAACGCG	+	24	17	45
31L1nPr1	GGATGCAACGTGCTCA	+	29	16	46
31L1nPr2	GGATGCAACGTGCTC	+	29	15	47

(continuación)

Nombre de la sonda	Secuencia 5' → 3'	Polaridad	Posición inicial en la Figura 1	Longitud	SEC ID N.º:
32L1nPr1	ACAGCAGGCACAAGGC	+	33	16	48
33L1nPr1	CATATTGGCTACAACGTG	+	23	18	49
33L1nPr2	CCATATTGGCTACAACG	+	22	17	50
33L1nPr3	CCATATTGGCTACAACGa	+	22	18	51
34L1nPr1	CCCAGGGACAAAACAA	+	41	16	52
35L1nPr1	AACCATATTGGTTGCAAC	+	20	18	53
35L1nPr2	TTGCAACGTGCACAAG	+	31	16	54
35L1nPr3	ACCATATTGGTTGCAAC	+	21	17	55
39L1nPr1	CCTTATTGGCTACATAAGG	+	22	19	56
39L1nPr2	CTTATTGGCTACATAAGG	+	23	18	57
40L1nPr1	AAGCCATTGTGGATACAA	+	19	18	58
42L1nPr1	CAACAAGCACAAAGGACA	+	34	17	59
43L1nPr2	AACCCTTATGGATACAAAAG	+	20	20	60
43L1 Pr1	AACCCTTATGGATACAAAA	+	20	19	61
44L1nPr1	AAGGCGCAGGGCCAC	+	37	15	62
44L1nPr2	TTTTGGTTGCAAAGGC	+	25	17	63
45L1nPr1	G GTTACATAAGGCCCCAG	+	29	17	64
45L1nPr2	GGTTACATAAGGCCCA	+	29	16	65
45L1nPr3	AGCCCAGGGCCATAAg	+	39	16	66
45L1nPr4	CCCAGGGCCATAACA	+	41	15	67
45L1nPr5	CCAGGGCCATAACAAg	+	42	16	68
51L1nPr1	TATTGGCTCCACCGTG	+	25	16	69
51L1nPr2	TTATTGGCTCCACCGT	+	24	16	70
51L1nPr3	ATTGGCTCCACCGTG	+	26	15	71
52L1nPr1	CGTACTGGTTACAACGTG	+	23	18	72
52L1nPr2	CCGACTG GTTACAACG a	+	22	18	73
52L1nPr3	GCCGACTGGTTACAAC	+	21	17	74
53L1nPr1	ACGTGCCCAGGGACAT	+	37	16	75
54L1nPr1	GCCCAGGGTCAAAACA	+	40	16	76
54L1nPr2	ACTGGTTACAACGGGC	+	26	16	77
55L1nPr1	TTTTTGGTTGCAAAGGG	+	24	17	78
55L1nPr2	TTTTGGTTGCAAAGGGC	+	25	17	79
56L1nPr1	CCAAGGCCATAATAAT	+	41	17	80

(continuación)

Nombre de la sonda	Secuencia 5' → 3'	Polaridad	Posición inicial en la Figura 1	Longitud	SEC ID N.º:
56L1nPr2	GCCCAAGGCCATAATA	+	40	16	81
56L1nPr3	TGCCCAAGGCCATAAT	+	39	16	82
56L1nPr4	GCCCAAGGCCATAATAAg	+	40	18	83
57L1nPr1	TTACTGGCTGCGGAGG	+	24	16	84
58L1nPr1	CTTATTGGCTACAGCGT	+	23	17	85
58L1nPr2	CTTATTGGCTACAGCGTG	+	23	18	86
59L1nPr1	AAGGCTCAGGGTTTAAAC	+	37	18	87
66L1nPr1	TTGCAACGTGCACAGG	+	31	16	88
66L1nPr2	TGCAACGTGCACAGG	+	32	15	89
67L1nPr1	CAACGCGCACAAAGGTC	+	34	16	90
67L1nPr2	ACAACGCGCACAAAGGT	+	33	16	91
68L1nPr1	GGCACAGGGACACAAC	+	39	16	92
68L1nPr2	GGCACAGGGACACAAG	+	39	16	93
69L1nPr1	G GTTACAG CGTGCCCA	+	29	16	94
6L1nPr1	GGCTACAAAAAGCCCAG	+	29	17	95
6L1nPr2	TGGCTACAAAAAGCCCA	+	28	17	96
70L1nPr1	CCTATTGGTTGCATAAGG	+	23	18	97
70L1nPr2	TATTGGTTGCATAAGGC	+	25	17	98
70L1nPr3	CCCTATTGGTTGCATAA	+	22	17	99
71L1nPr1	GCCTTACTGGCTACAAC	+	21	17	100
72L1nPr1	CTATTGGCTACAGCGC	+	24	16	101
72L1nPr2	CGCCCAGGGTCACAA	+	39	15	102
73L1nPr1	GCACAGGGACAAAATAA	+	40	17	103
74L1nPr1	CCTTTTGGCTACAAAAGG	+	23	18	104
7L1nPr1	AACCTTTGTGGATACAAAA	+	20	19	105
81L1nPr1	GCTACAACGGGCACAG	+	30	16	106
81L1nPr2	CCTTATTGGCTACAACG	+	22	17	107
82L1nPr1	TTATTG GTTGCATCGCG	+	24	17	108
83L1nPr1	TACTGGCTGCATCGTG	+	25	16	109
89L1nPr1	TACTGGTTGCAAAAGGC	+	25	17	110
85L1nPr1	CTGCACAAAGCCCAGG	+	31	16	111
85L1nPr2	CTGCACAAAGCCCAG	+	31	15	112
85L1nPr3	TGCACAAAGCCCAGG	+	32	15	113

(continuación)

Nombre de la sonda	Secuencia 5' → 3'	Polaridad	Posición inicial en la Figura 1	Longitud	SEC ID N.º:
86L1nPr1	GGTTACAGAAGGCGCA	+	29	16	114
87L1nPr1	TATTGGCTGCAGCGGG	+	25	16	115
89L10nPr1	TATTGGCTGCACCGTG	+	25	16	116
90L1nPr1	TACTGGCTGCAACGAG	+	25	16	117
91L1nPr1	AACCGCTTTGGATGCAA	+	20	17	118

El nucleótido en minúscula indica que no es específico del HPV

Información adicional que indica aquellas sondas enumeradas anteriormente a las que se puede añadir una cola T en el extremo 3', si se desea.

Nombre	Secuencia de la sonda	Inicio	Longitud	Cola T	SEC ID N.º:
11L1nPr1	GGCTTCAAAAAGGCTCAG	29	17		<u>32</u>
13L1nPr1	ATTGGTTACAAAAGGCC	26	17		<u>33</u>
13L1nPr2	TGGTTACAAAAGGCC	28	16		<u>34</u>
16AF1L1p1.CH	ggtGTTGCAACGAGCACA	27	15		281
16AF1L1p2.CH	ggGGTTGCAACGAGCAC	27	15		282
16AF1L1p3.CH	ATATTGGTTGCAACGAG	24	17		283
16AF1L1p4.CH	cTATTGGTTGCAACGAG	24	16		284
16AF1L1p5.CH	TTGGTTGCAACGAGC	27	15	<b>100xT en 3'</b>	285
16AF1L1p6.CH	GGTTGCAACGAGCA	29	14	<b>100xT en 3'</b>	286
16AF1L1p7.CH	TGGTTGCAACGAGC	28	14	<b>100xT en 3'</b>	287
16L1nPr1	TTATTGGTTACAACGAGCA	24	19		35
16L1nPr2.CH	TTATTGGTTACAACGAGC	24	18		36
16L1nPr3.CH	CTTATTGGTTACAACGAG	23	18		37
16L1nPr4.CH	GAGCACAGGGCCAC	38	14	<b>100xT en 3'</b>	288
16L1nPr5.CH	AGCACAGGGCCACA	39	14	<b>100xT en 3'</b>	289
18L1nPr1	AGGCACAGGGTCATAAC	38	17		38
18L1nPr2	AGGCACAGGGTCATAAg	38	16		39
18L1nPr3	AAGGCACAGGGTCATAAg	37	17		40
18L1nPr4	GTTACATAAGGCACAGG	30	17		41
18L1nPr4.CH	agtGTTACATAAGGCACAGG	27	17		290
18L1nPr5.CH	agttTACATAAGGCACAGG	27	16		291
18L1nPr6.CH	ccccTTACATAAGGCACAGG	27	16		292
18L1nPr7.CH	TTACATAAGGCACAGG	31	16	<b>100xT en 3'</b>	293

ES 2 380 115 T3

(continuación)

Nombre	Secuencia de la sonda	Inicio	Longitud	Cola T	SEC ID N.º:
26L1nPr2	TGGTTACAACGTGCACA	28	17		43
26L1nPr1.CH	GTGCACAGGGTCATAAT	38	17		294
26L1nPr3.CH	GTGCACAGGGTCATAA	38	16		295
26L1nPr4.CH	ACGTGCACAGGGTC	36	15		296
26L1nPr5.CH	TGCACAGGGTCATAATA	39	17	<b>100xT en 3'</b>	297
26L1nPr6.CH	TGCACAGGGTCATAAT	39	16	<b>100xT en 3'</b>	298
26L1nPr7.CH	GTTACAACGTGCACAG	30	16	<b>100xT en 3'</b>	299
30L1nPr1	TACTGGTTGCAACGCG	25	16		44
30L1nPr2	TTACTGGTTGCAACGCG	24	17		45
31L1nPr1	GGATGCAACGTGCTCA	29	16		46
31L1nPr2	GGATGCAACGTGCTC	29	15		47
31L1nPr3.CH	ggGGATGCAACGTGCTC	27	15		300
31L1nPr4.CH	ACCATATTGGATGCAAC	21	17		301
31L1nPr5.CH	CATATTGGATGCAACG	23	16		302
31L1nPr6.CH	GGATGCAACGTGCTC	29	15	<b>100xT en 3'</b>	303
32L1nPr1	ACAGCAGGCACAAGGC	33	16		48
33L1nPr1	CATATTGGCTACAACGTG	23	18		49
33L1nPr2	CCATATTGGCTACAACG	22	17		50
33L1nPr3	CCATATTGGCTACAACGa	22	17		51
33L1nPr3.CH	CCATATTGGCTACAACG	22	17		304
33L1nPr4.CH	CATATTGGCTACAACGT	23	17		305
34L1nPr1	CCCAGGGACAAAACAA	41	16		52
35L1nPr1	AAC CATATTGGTTGCAAC	20	18		53
35L1nPr2.CH	TTGCAACGTGCACAAG	31	16		54
35L1nPr3.CH	ACCATATTGGTTGCAAC	21	17		55
35L1nPr4.CH	GTGCACAAGGCCATAAg	38	16	<b>100xT en 3'</b>	306
35L1nPr5.CH	TTGCAACGTGCACAAG	31	16	<b>100xT en 3'</b>	307
35L1nPr6.CH	GTGCACAAGGCCATA	38	15	<b>100xT en 3'</b>	308
35L1nPr7.CH	TGCACAAGGCCATA	39	14	<b>100xT en 3'</b>	309
39L1nPr1	CCTTATTGGCTACATAAGG	22	19		56
39L1nPr2	CTTATTGGCTACATAAGG	23	18		57
39L1nPr3.CH	AGCCTTATTGGCTACATAA	20	19		310
39L1nPr4.CH	GCCTTATTGGCTACATAA	21	18		311

ES 2 380 115 T3

(continuación)

Nombre	Secuencia de la sonda	Inicio	Longitud	Cola T	SEC ID N.º:
39L1nPr5.CH	AAGCCTTATTGGCTACATAA c	19	20	<b>100xT en 3'</b>	312
39L1nPr6.CH	GCCTTATTGGCTACATAAG	21	19		313
40L1nPr1	AAGCCATTGTGGATACAA	19	18		58
42L1nPr1	CAACAAGCACAAGGACA	34	17		314
43L1nPr1	AACCCTTATGGATACAAAA	20	19		315
43L1nPr2	AACCCTTATGGATACAAAAG	20	20		60
44L1nPr1	AAGGCGCAGGGCCAC	37	15		62
44L1nPr2	TTTTGGTTGCAAAAGGC	25	17		63
45L1nPr1	GGTTACATAAG GCCCAG	29	17		64
45L1nPr2	GGTTACATAAGGCCCA	29	16		65
45L1nPr3	AGCCCAGGGCCATAAg	39	15		66
45L1nPr4	CCCAGGGCCATAACA	41	15		67
45L1nPr5	CCAGGGCCATAACAAG	42	15		68
45L1nPr6.CH	ggtGTTACATAAGGCCCAG	27	16		316
45L1nPr7.CH	CCAGGGC CATAACAA	42	15		317
45L1nPr8.CH	CCAGGGCCATAACAAG	42	15	<b>100xT en 3'</b>	318
45L1nPr9.CH	AAGCCATATTGGTTACATA	19	19	<b>100xT en 3'</b>	319
45L1nPr10.CH	TTACATAAGGCCCAGG	31	16	<b>100xT en 3'</b>	320
51L1nPr1	TATTGGCTCCACCGTG	25	16		69
51L1nPr3	ATTGGCTCCACCGTG	26	15		71
51L1nPr2.CH	TTATTGGCTCCACCGT	24	16		321
51L1nPr4.CH	ggATTGGCTCCACCGTG	24	15		322
52L1nPr1	CGTACTGGTTACAACGTG	23	18		72
52L1nPr2	CCGTA CTGGTTACAACGa	22	17		73
52L1nPr3a	GCCGTA CTGGTTACAAC	21	17		323
52L1nPr3.CH	CCGTA CTGGTTACAAC	22	16		324
52L1nPr4.CH	ACCGTA CTGGTTACAAC	21	17		325
53L1nPr1.CH	ACGTGCC CAGGACAT	36	16		326
53L1nPr2.CH	AACGTGCC CAGGAC	35	15		327
c53L1nPr3.CH	ACGTGCC CAGGAC	36	14		328
53L1nPr4.CH	TGCC CAGGACATA	39	14	<b>100xT en 3'</b>	329
53L1nPr5.CH	GCCCAGG GACATAAT	40	15	<b>100xT en 3'</b>	330
53L1CPr6.CH	ATATTGGCTGCAACGT	24	16		331

ES 2 380 115 T3

(continuación)

Nombre	Secuencia de la sonda	Inicio	Longitud	Cola T	SEC ID N.º:
53L1CPr7	TATTGGCTGCAACGT	25	15		332
54L1nPr1	GCCCAGGGTCAAAACA	40	16		76
54L1nPr2	ACTGGTTACAACGGGC	26	16		77
55L1nPr1	TTTTTGGTTGCAAAGGG	24	17		78
55L1nPr2	TTTTGGTTGCAAAGGGC	25	17		78
56L1nPr1	CCCAAGGCCATAATAAT	41	17		80
56L1nPr2	GCCCAAGGCCATAATA	40	16		81
56L1nPr3	TGCCCAAGGCCATAAT	39	16		82
56L1nPr4	GCCCAAGGCCATAATAAg	40	17		83
56L1nPr4.CH	gGCCCAAGGC CATAATAA	39	17		333
56L1nPr5.CH	gGCCCAAGGCCATAATA	39	16		334
56L1nPr6.CH	TGCCCAAGGCCATAAT	39	16		335
57L1nPr1	TACTGGCTGCGGAGG	24	16		84
58L1nPr2	CTTATTGGCTACAGCGTG	23	18		86
58L1riPr1.CH	CTTATTGGCTACAGCGT	23	17		336
58L1nPr3.CH	CTTATTGGCTACAGCG	23	16		337
59L1nPr1	AAGGCTCAGGGTTTAAAC	37	18		87
59Pr2.CH	CAAGGCTCAGGGTTTAAA	36	18		338
59L1nPr3.CH	CAAGGCTCAGGGTTTAA	36	17		339
61L1nCPPr1	AGGGCCACAACAATG	44	15		340
61L1nCPPr2	GGGCCACAACAATG	45	14		341
66L1nPr1	TTGCAACGTGCACAGG	31	16		88
66L1nPr2	TGCAACGTGCACAGG	32	15		89
66L1nPr2.CH	gTGCAACGTGCACAGG	31	15		342
66L1nPr3.CH	ggGCAACGTGCACAGG	31	14		343
66L1nPr4.CH	TGCAACGTGCACAGG	32	15	<b>100xT en 3'</b>	344
c66L1nPr5.CH	GCAACGTGCACAGG	33	14	<b>100xT en 3'</b>	345
66L1nPr6.CH	TGCACAGGGCCATA	39	14	<b>100xT en 3'</b>	346
66L1nPr7.CH	TGCAACGTGCACAG	32	14	<b>100xT en 3'</b>	347
67L1nPr1	CAACGCGCACAAGGTC	34	16		90
67L1nPr2	ACAACGCGCACAAGGT	33	16		91
68L1nPr1	GGCACAGGGACACAAC	39	16		92
68L1nPr2	GGCACAGGGACACAAG	39	15		93
68L1nPr2.CH	GGCACAGGGACACAA	39	15		348

ES 2 380 115 T3

(continuación)

Nombre	Secuencia de la sonda	Inicio	Longitud	Cola T	SEC ID N.º:
68L1nPr3.CH	AGGCACAGGGACACA	38	15		349
68L1nPr4.CH	GGCACAGGGACACA	39	14		350
68L1nPr5.CH	GGCACAGGGACACA	39	14	<b>100xT en 3'</b>	351
68L1nPr6.CH	CCCTATTGGCTGCAC	22	15	<b>100xT en 3'</b>	352
68L1nPr7.CH	GCTGCACAAGGCACA	30	15	<b>100xT en 3'</b>	353
68L1nPr8.CH	CTGCACAAGGCACAG	31	15	<b>100xT en 3'</b>	354
68L1nPr9.CH	GCTGCACAAGGCAC	30	14	<b>100xT en 3'</b>	355
68L1nPr10.CH	GCACAAGGCACAGG	33	14	<b>100xT en 3'</b>	356
69L1nPr1	GGTTACAGCGTGCCCA	29	16		94
6L1nPr1	GGCTACAAAAAGCCCAG	29	17		95
6L1nPr2	TGGCTACAAAAAGCCCA	28	17		96
70L1nPr1	CCTATTGGTTGCATAAGG	23	18		97
70L1nPr2	TATTGGTTGCATAAGGC	25	17		98
70L1nPr3.CH	CCCTATTGGTTGCATAA	22	17		357
70L1nPr4.CH	CCTATTGGTTGCATAAGG	23	18		358
71L1nPr1	GCCTTACTGGCTACAAC	21	17		100
72L1nPr1	CTATTGGCTACAGCGC	24	16		101
72L1nPr2	CGCCCAGGGTCACAA	39	15		102
73L1nPr1	GCACAGGGACAAAATAA	40	17		103
74L1nPr1	CCTTTTGGCTACAAAAGG	23	18		104
7L1nPr1	AACCTTTGTGGATACAAAA	20	19		105
81L1nPr1	GCTACAACGGGCACAG	30	16		106
81L1nPr2	CCTTATTGGCTACAACGn	22	17		107
82L1nPr1	TTATTGGTTGCATCGCG	24	17		108
82L1nPr2.CH	gTATTGGTTGCATCGCG	24	16		359
82L1nPr3.CH	ATTGGTTGCATCGCG	26	15	<b>100xT en 3'</b>	360
83L1nPr1	TACTGGCTGCATCGTG	25	16		109
84L1nPr1	TACTGGTTGCAAAAGGC	25	17		110
85L1nPr1	CTGCACAAAGCCCAGG	31	16		111
85L1nPr2	CTGCACAAAGCCCAG	31	15		112
85L1nPr3	TG CACAAAGCCCAGG	32	15		113
86L1nPr1	GGTTACAGAAG GCGCA	29	16		114
87L1nPr1	TATTGGCTGCAGCGGG	25	16		115
89L1nPr1	TATTGGCTGCACCGTG	25	16		116

(continuación)

Nombre	Secuencia de la sonda	Inicio	Longitud	Cola T	SEC ID N.º:
90L1nPr1	TACTGGCTGCAACGAG	25	16		117
91L1nPr1	AACCGCTTTGGATGCAA	20	17		118
El nt en minúscula indica no específico					

**Ejemplos introductorios 2-12****MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS:****5 El procedimiento de hibridación estándar (en etapas) según Wallace *et al.* (2005) *supra* es el siguiente:**

1. Se seleccionan los conjuntos apropiados de microesferas acopladas a oligonucleótidos.
  2. Se vuelven a suspender las microesferas mediante movimientos vorticiales y tratamiento de ultrasonidos durante aproximadamente 20 segundos.
  - 10 3. Se prepara una mezcla de microesferas de trabajo diluyendo los patrones de microesferas acopladas hasta 150 microesferas por cada conjunto/ $\mu$ l en 1,5 x tampón de hibridación de TMAC (1 x TMAC = 2 mol/l de TMAC/Sarkosyl al 0,15%/75 mmol/l de Tris, 6 mmol/l de EDTA) (Nota: se requieren 33  $\mu$ l de mezcla de microesferas de trabajo para cada reacción).
  4. Se mezcla la mezcla de microesferas de trabajo mediante movimientos vorticiales y tratamiento de ultrasonidos durante aproximadamente 20 segundos.
  - 15 5. Se añaden a cada muestra o pocillo de fondo, 33  $\mu$ l de mezcla de microesferas de trabajo.
  6. Se añaden 17  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O desionizada a cada pocillo de fondo.
  7. Se añade a cada pocillo de muestra ADN biotilado amplificado y H<sub>2</sub>O desionizada hasta un volumen total de 17  $\mu$ l (Nota: se usan 7  $\mu$ l de reacción PCR para la detección).
  8. Se mezclan los pocillos de reacción suavemente moviendo la pipeta hacia arriba y hacia abajo varias veces.
  - 20 9. Se incuba a 99°C durante 5 minutos para desnaturalizar el ADN biotilado amplificado en un termociclador.
  10. Se incuba la placa de reacción a la temperatura de hibridación (55°C) durante 15 minutos.
  11. Durante la incubación, se prepara una placa filtrante aclarando dos veces con 1 x TMAC enfriado con hielo. A continuación, se llena cada pocillo de la placa filtrante con 1 x TMAC enfriado con hielo.
  - 25 12. Durante la incubación, se prepara mezcla indicadora nueva diluyendo estreptavidina-R-ficoeritrina hasta 2  $\mu$ g/ml en 1 x tampón de hibridación de TMAC (Nota: se requieren 17  $\mu$ l de mezcla indicadora para cada reacción) y se colocan en un horno o en un baño de agua a la temperatura de hibridación.
  13. Se finaliza la reacción de hibridación transfiriendo toda la reacción a la placa filtrante que contiene tampón de lavado enfriado con hielo.
  14. Tras la transferencia, se lava la placa filtrante en condiciones rigurosas dos veces con 1 x tampón de lavado de TMAC enfriado con hielo mediante una filtración al vacío intermedia.
  - 30 15. Se añaden 75  $\mu$ l de mezcla indicadora a cada pocillo y se mezclan suavemente moviendo la pipeta varias veces hacia arriba y hacia abajo.
  16. Se deja que toda la placa alcance la temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.
  17. Se incuba la placa de reacción a la temperatura de hibridación durante 30 minutos.
  - 35 18. Se finaliza la incubación mediante filtración al vacío.
  19. Se lava dos veces con 1 x tampón de lavado de TMAC mediante una filtración al vacío intermedia.
  20. Se disuelve una reacción con 1 x tampón de lavado de TMAC mediante una filtración al vacío intermedia.
  21. Se analiza a temperatura ambiente en el analizador Luminex™ 100 según el manual del sistema.
- [Véase la Figura 6. Esquema general del flujo de trabajo según lo descrito por Wallace *et al.* (2005)].
- 40 La sensibilidad y la especificidad de la prueba se basan en la hibridación específica entre las secuencias de ácido nucleico sonda y diana. Por lo tanto, la hibridación y el lavado, pero también la incubación con PE parecieron ser etapas esenciales en el procedimiento. Se adaptó el protocolo para maximizar la especificidad y la sensibilidad de la reacción, optimizando diferentes parámetros, tales como temperaturas y cinéticas de difusión. Estas adaptaciones se indican en el protocolo optimizado de hibridación (véase más adelante).

45

Materiales:

**A. Tampones**

<b>MES 0,1M, pH 4,5 (TAMPÓN DE ACOPLAMIENTO)</b>			
Reactivo	N.º de catálogo	Concentración final	Cantidad/ 250 ml
MES (ácido 2[ <i>N</i> -morfolino]etanosulfónico)	Sigma M-2933	0,1M	4,88 g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	-	-	Hasta 250 ml
NaOH 5N	Fisher SS256-500	-----	~ 5 gotas
<b>Se esteriliza el filtro (45 µm) y se almacena a 4°C</b>			

<b>TWEEN al 0,02% (TAMPÓN DE LAVADO I)</b>			
Reactivo	N.º de catálogo	Concentración final	Cantidad/ 250 ml
TWEEN 20 (Monolaurato de polioxietilensorbitán)	Sigma P-9416	0,02%	50 µl
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	-----	-----	250 ml
<b>Se esteriliza el filtro (45 µm) y se almacena a temperatura ambiente</b>			

<b>Sarkosyl al 20%</b>			
Reactivo	N.º de catálogo	Concentración final	Cantidad/ 250 ml
Sarkosyl ( <i>N</i> -Lauroilsarcosina)	Sigma L-9150	20%	50 g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	-----	-----	250 ml (ajustar hasta)
<b>Se esteriliza el filtro (45 µm) y se almacena a temperatura ambiente</b>			

<b>TE, pH 8,0 (DILUYENTE DE LA MUESTRA)</b>			
Reactivo	N.º de catálogo	Concentración final	Cantidad/ 250 ml
100 x tampón de Tris-EDTA, pH 8,0	Sigma T-9285	1 x	2,5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	-----	-----	247,5 ml
<b>Se esteriliza el filtro (45 µm) y se almacena a temperatura ambiente</b>			

5

<b>4,5 x SSC / Tampón de hibridación de Sarkosyl al 0,15% (DILUYENTE DE LAS MICROESFERAS)</b>			
Reactivo	N.º de catálogo	Concentración final	Cantidad/50 ml
20 x SSC (Cloruro de sodio 3M, citrato de sodio deshidratado 0,3M , pH 7,0)	Cambrex US51232	x 4,5	11,25 ml
Sarkosyl al 20%	-----	0,15%	0,375 ml
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	-----	-----	38,375 ml
<b>Se esteriliza el filtro (45 µm) y se almacena a temperatura ambiente</b>			

<b>3 x SSC / Sarkosyl al 0,1%/ 1mg/ml de tampón de lavado riguroso de caseína</b>			
<b>Reactivo</b>	<b>N.º de catálogo</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Cantidad/50 ml</b>
20 x SSC	Cambrex US51232	x 3	7,5 ml
Sarkosyl al 20%	-----	0,1%	0,250 ml
50 mg/ml de caseína (pH 7,2)	VWR BDHA440203H	-----	1 ml
H <sub>2</sub> Od	-----	-----	41,25 ml
<b>Se esteriliza el filtro (45 µm) y se almacena a 4°C</b>			

<b>1 x SSC / Sarkosyl al 0,1%/ 1mg/ml de tampón de lavado de caseína</b>			
<b>Reactivo</b>	<b>N.º de catálogo</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Cantidad/50 ml</b>
20 x SSC	Cambrex US51232	x 1	2,5 ml
Sarkosyl al 20%	-----	0,1%	0,250 ml
50 mg/ml de caseína (pH 7,2)	VWR BDHA440203H	-----	1 ml
H <sub>2</sub> Od	-----	-----	46,25 ml
<b>Se esteriliza el filtro (45 µm) y se almacena a 4°C</b>			

**B. Perlas**

1. Los tipos usados de perlas son L100-C123-01 a L100-C172-01 (Luminex™ Corp., Austin, TX).

5 **C. Sondas (véanse los ejemplos)**

1. Las sondas se adquirieron en Eurogentec (Seraing, Bélgica)

**D. Equipo**

<b>Equipo</b>	<b>Tipo</b>
Termociclador	ABI GeneAmp PCR system 9700
Termomezclador	EppendorfThermomixer comfort
Baño de agua	GFL 1001
Horno de incubación	Memmert U25U
Luminex™	Luminex™ x 100

**Procedimientos y protocolos:**10 **I. Acoplamiento de las sondas**

1. Se lleva hasta la temperatura ambiente una alícuota recién preparada de polvo desecado de EDC [clorhidrato de 1-etil-3-[dimetilaminopropil]carbodiimida] de Pierce a -20°C.

2. Se vuelve a suspender el oligonucleótido sustituido con amina ("sonda" u oligo de "captura") hasta 0,2mM (0,2 nmol/µl) en H<sub>2</sub>O desionizada.

15 3. Se vuelve a suspender el patrón de microesferas mediante movimientos vorticiales y tratamiento de ultrasonidos durante aproximadamente 20 segundos.

4. Se transfieren  $5,0 \times 10^6$  de patrón de microesferas a un tubo de microcentrifugación de USA Scientific.

5. Se sedimenta el patrón de microesferas mediante microcentrifugación a  $\geq 8.000$  xg durante 1-2 minutos.

6. Se retira el sobrenadante y se vuelven a suspender las microesferas sedimentadas en 50 µl de MES 0,1M, pH 4,5

mediante movimientos vorticiales y tratamiento de ultrasonidos durante aproximadamente 20 segundos.

7. Se prepara una dilución 1:10 del oligo de captura 0,2mM en H<sub>2</sub>O desionizada (0,02 nmol/μl).

8. Se añaden 2μl (0,04 nmol) del oligo de captura diluido 1:10 a las microesferas resuspendidas y se mezcla mediante movimientos vorticiales.

5 9. Se prepara una solución nueva de 20 mg/ml de EDC en H<sub>2</sub>O desionizada. Se disuelven 10 mg de EDC en 500 μl de H<sub>2</sub>O desionizada, como máximo 1 minuto antes de su uso. Se almacenaron alícuotas de 10 mg de EDC (polvo) en seco a -80°C envasadas conjuntamente con gel de sílice.

10. Se añaden a cada una de las reacciones 2,5 μl de EDC 20 mg/ml recién preparados a las microesferas y se mezclan mediante movimientos vorticiales (Nota: ahora se debe desechar la alícuota de polvo de EDC).

10 11. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

12. Se prepara una segunda solución nueva de 20 mg/ml de EDC en H<sub>2</sub>O desionizada.

13. Se añaden a cada reacción 2,5 μl de EDC 20 mg/ml recién preparados a las microesferas y se mezclan mediante movimientos vorticiales (Nota: ahora se debe desechar la alícuota de polvo de EDC).

14. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

15 15. Se añaden 1,0 ml de Tween-20 al 0,02% a las microesferas acopladas.

16. Se sedimentan las microesferas acopladas mediante microcentrifugación a  $\geq 8.000$  xg durante 1-2 minutos.

17. Se elimina el sobrenadante y se vuelven a suspender las microesferas acopladas en 1,0 ml de SDS al 0,1% mediante movimientos vorticiales.

18. Se sedimentan las microesferas acopladas mediante microcentrifugación a  $\geq 8.000$  xg durante 1-2 minutos.

20 19. Se retira el sobrenadante y se vuelven a suspender las microesferas acopladas en 100 μl de TE, pH 8,0 mediante movimientos vorticiales y tratamiento de ultrasonidos durante aproximadamente 20 segundos.

20. Se sedimentan las microesferas acopladas mediante microcentrifugación a  $\geq 8.000$  xg durante 1-2 minutos.

21. Se retira el sobrenadante y se vuelven a suspender las microesferas acopladas en 100 μl de TE, pH 8,0 mediante movimientos vorticiales y tratamiento de ultrasonidos durante aproximadamente 20 segundos.

25 22. Se enumeran las microesferas acopladas mediante un hemacitómetro:

a. Se diluyen las microesferas acopladas resuspendidas 1:100 en H<sub>2</sub>O desionizada.

b. Se mezclan bien mediante movimientos vorticiales.

c. Se transfieren 10 μl al hemacitómetro.

d. Se cuentan las microesferas de los 4 cuadrados grandes de la rejilla del hemacitómetro.

30 e. Microesferas/μl = (Suma de microesferas en los 4 cuadrantes grandes) x 2,5 x 100 (factor de dilución). (Nota: el máximo es 50.000 microesferas/μl).

23. Se almacenan las microesferas acopladas con refrigeración a 2-10°C en la oscuridad.

## II. Protocolo optimizado de hibridación y lavado

1. Se seleccionan los conjuntos apropiados de microesferas acopladas a oligonucleótidos.

35 2. Se vuelven a suspender las microesferas mediante movimientos vorticiales y tratamiento de ultrasonidos durante aproximadamente 20 segundos.

3. Se prepara una mezcla de microesferas de trabajo diluyendo los patrones de microesferas acopladas hasta 150 microesferas por cada conjunto/μl en 4,5 x tampón de hibridación de SSC/Sarkocyl al 0,15% (Nota: se requieren 33 μl de mezcla de microesferas de trabajo para cada reacción).

40 4. Se mezcla la mezcla de microesferas de trabajo mediante movimientos vorticiales y tratamiento de ultrasonidos durante aproximadamente 20 segundos.

5. Se añaden a cada muestra o pocillo de fondo 33 μl de mezcla de microesferas de trabajo.

6. Se añaden 17 μl de TE, pH 8 a cada pocillo de fondo.

45 7. Se añade a cada pocillo de muestra ADN biotilado amplificado y TE, pH 8,0, hasta un volumen total de 17 μl (Nota: habitualmente, para la detección bastan 4 μl de una reacción PCR potente de 50 μl).

8. Se mezclan los pocillos de reacción suavemente moviendo la pipeta hacia arriba y hacia abajo varias veces.

9. Se incuba a 95-100°C durante 5 minutos para desnaturalizar el ADN biotilado amplificado en un termociclador.

10. Se incuba la placa de reacción a 60°C durante 3 minutos en un termociclador.

50 11. Se transfiere la placa de reacción a un termomezclador precalentado a la temperatura de hibridación (Nota: se puede usar un pipeteador de 8 canales para transferir las reacciones a 8 pocillos simultáneamente).

12. Se incuba la placa de reacción a la temperatura de hibridación durante 15 minutos y 500 rpm.

13. Durante la incubación, se prepara la placa con filtro Millipore aclarando con agua destilada. A continuación, se llena cada pocillo de la placa filtrante con 200 μl de 3 x tampón de lavado de SSC/Sarkosyl al 0,1%/1 mg/ml de caseína a la temperatura de hibridación y se colocan en un horno a la temperatura de hibridación.

55 14. Durante la incubación, se prepara mezcla indicadora nueva diluyendo estreptavidina-R-ficoeritrina hasta 2 μg/ml

en 3 x tampón de lavado riguroso de SSC/ Sarkocyl al 0,1%/ 1 mg/ml de caseína (Nota: se requieren 75 µl de mezcla indicadora para cada reacción) y se colocan en un horno o en un baño de agua a la temperatura de hibridación.

15. Se finaliza la reacción de hibridación transfiriendo toda la reacción a la placa filtrante que contiene tampón de lavado a la temperatura de hibridación.

5 16. Tras la transferencia, se lava la placa filtrante dos veces con 100 µl de 3 x SSC/Sarkocyl al 0,1%/1 mg/ml de tampón de lavado restrictivo de caseína a la temperatura de hibridación intercalando con una filtración al vacío.

17. Se añaden 75 µl de mezcla indicadora a cada pocillo y se mezclan suavemente moviendo la pipeta varias veces hacia arriba y hacia abajo.

18. Se incuba la placa de reacción a la temperatura de hibridación durante 15 minutos.

10 19. Se finaliza la incubación mediante filtración al vacío.

20. Se lava dos veces con 100 µl de 1 x tampón de lavado de SSC/Sarkocyl al 0,1%/1 mg/ml de caseína a temperatura ambiente mediante una filtración al vacío intermedia.

21. Se disuelve una reacción en 100 µl de 1 x tampón de lavado de SSC/Sarkosyl al 0,1%/1 mg/ml de caseína a temperatura ambiente.

15 22. Se analizan 50 µl a temperatura ambiente en el analizador Luminex™ 100 según el manual del sistema.

### III. Lectura

1. La lectura de los datos se realizó usando el programa Luminex™ 100 IS versión 2.3

2. Durante la medición, se usaron los siguientes parámetros:

a. Volumen de la muestra: 50 µl

20 b. Límite de tiempo de la muestra: 60 s

c. Temperatura del calentador XY (°C): 35

d. Portal del discriminador de dobles:

i. Límite inferior: 8000

ii. Límite superior 18500

25 e. Datos estadísticos: media

### IV. Tratamiento de datos

1. Los datos se guardaron en un archivo CSV sin procesar (\*.csv delimitado por coma) que contenía todos los resultados estándar proporcionados por el programa Luminex™100 IS2.3.

30 2. Se transfirieron las señales medias obtenidas a un archivo Excel para calcular la proporción entre diana y sonda y la relación señal-ruido (véase también la distribución y los cálculos).

La presente invención aborda diferentes elementos del procedimiento Luminex™, incluyendo la optimización del diseño de la sonda y la optimización del protocolo de prueba.

En el siguiente texto, se presentarán los datos en orden del flujo de trabajo como se resumen en la Figura 2.

### Figura 6. Esquema general del flujo de trabajo adaptado

#### 35 Presentación de los resultados de los ejemplos (distribución y cálculos):

Los ejemplos y las reivindicaciones se especifican y se explican de la siguiente manera. Los resultados se presentan principalmente en forma de tablas que contienen los datos brutos (IFM = Intensidad fluorescente media), variables (p.ej., temperatura), sondas y dianas analizadas, cálculos y observaciones. Los cálculos incluyen una proporción entre diana y sonda (% de diana/sonda) y una relación señal-ruido (señal/ruido).

40 La proporción entre la diana y la sonda se calcula por sonda y muestra cada una de las señales como un porcentaje del control positivo que se fija en el 100% (véase también el ejemplo de la Tabla 15).

La relación señal-ruido también se calcula por sonda. Cada señal se divide entre la media de todas las señales obtenidas (véase también la Tabla 16 de ejemplos).

45 Tanto la proporción entre sonda y señal como la relación señal-ruido aportan una buena perspectiva general sobre la intensidad y la especificidad de la señal.

Algunos ejemplos usan sondas del cebador SPF10 y conjuntos de sondas descritos en el documento EP1012348. Dicha patente proporciona antecedentes técnicos de las técnicas usadas en la presente solicitud de patente.

50 El conjunto de cebadores SPF10 genera pequeños amplímeros de una longitud de sólo 65 pb con una región entre cebadores de 22 nucleótidos. Esto limita gravemente las posibilidades de colocar las sondas con respecto a los diferentes apareamientos erróneos entre todos los genotipos del HPV.

**Ejemplo 2****Objetivo:**

Examinar si el mantenimiento de la temperatura de hibridación después de la etapa de hibridación tiene un efecto positivo relevante sobre la especificidad de la señal.

**5 Introducción:**

Tras la hibridación entre la sonda inmovilizada sobre la perla y la secuencia diana desnaturalizada en disolución, es necesario lavar el material no unido antes de la incubación con el reactivo indicador de estreptavidina-R-ficoeritrina (PE). Esto se realiza usando una placa filtrante (MSBVN12, Millipore) en la que las perlas y todas las moléculas unidas se separan de las moléculas libres de la solución. El volumen de reacción es pequeño y, por tanto, es vulnerable a los cambios de temperatura rápidos producidos en su medio. Se examinó el efecto de los cambios en la temperatura tras la temperatura de hibridación.

**Materiales y procedimientos**

Se investigó el efecto de la incubación a una temperatura inferior a la de hibridación en la señal del Luminex™ usando un sistema modelo SPF<sub>10</sub>.

15 Se usó una perla Luminex™, que portaba una sonda para HPV 31 (sonda 31SLPr31, véase la Tabla 5a). Esta sonda es específica de la identificación de las secuencias del HPV 31 amplificadas con el conjunto de cebadores SPF<sub>10</sub>. Para analizar cualquier reactividad cruzada, se usaron amplímeros de HPV44 y HPV16. Las secuencias diana del HPV 31 y HPV 44 difieren en 1 posición y las secuencias diana de las secuencias de HPV 31 y HPV 16 difieren en 4 posiciones (Tabla 5b).

20 La hibridación se realizó a 50°C y los análisis se realizaron por duplicado. Posteriormente, se trató un conjunto de reacciones según el protocolo estándar y se lavaron inmediatamente las perlas en la placa filtrante a 4°C. Primero se incubó el conjunto de reacciones por duplicado a temperatura ambiente (T.A.) durante 1 minuto antes de iniciar el lavado estándar a 4°C. Al contrario de Wallace *et al* (2005), el tampón de lavado se añadió una vez transferidas las muestras a la placa filtrante (véase también el Ejemplo 3).

**25 Resultados:**

Los resultados se muestran en la Tabla 5c. Como se demuestra, la incubación a T.A. durante sólo 1 minuto tras la hibridación y antes del lavado riguroso provoca un aumento de la señal, pero también disminuye la especificidad (como se muestra por las señales más elevadas observadas para HPV44). Esto se puede explicar mediante la reducción de la rigurosidad provocada por una breve caída de la temperatura tras la hibridación.

**30 Conclusión**

Se ha de mantener la temperatura de la reacción tras la etapa de hibridación. Tras la hibridación, se han de lavar las perlas tan rápido como sea posible sin ningún retraso para evitar cualquier disminución de la temperatura.

**Ejemplo 3****Objetivo:**

35 Examinar si un tampón de dilución, inmediatamente después de la hibridación, tiene un efecto positivo relevante en la especificidad de la señal.

**Introducción:**

40 El procedimiento analítico Luminex™ estándar comprende un riesgo por la introducción de unión inespecífica si el lavado no se realiza inmediatamente después de la etapa de hibridación (véase también el Ejemplo 2). Para minimizar este riesgo, se examinó la dilución de la muestra inmediatamente después de la hibridación.

**Materiales y procedimientos:**

Para investigar este efecto, se usó una mezcla de dos perlas Luminex™. Una perla portaba una sonda para HPV 31 (nombre: 31SLPr31, véase la Tabla 6a) y la otra perla portaba HPV 51 (nombre: 51SLPr2, véase la Tabla 6a). Estas sondas son específicas de la identificación de las secuencias del HPV 31 y HPV 51 amplificadas con el conjunto de cebadores SPF<sub>10</sub>, respectivamente. Para observar la posible reactividad cruzada con 31SLPr31, se usaron amplímeros de HPV44 y HPV16. Las secuencias diana de HPV 31 y HPV 44 y 16 difieren en 1 y 4 posiciones, respectivamente (Tabla 6b). Para observar la posible reactividad cruzada con 51SLPr2, se usaron amplímeros de HPV33 y HPV16. Las secuencias diana de HPV 51 y HPV 44 y 16 difieren en 4 posiciones (Tabla 6c).

La hibridación se realizó a 50°C, usando el protocolo estándar.

Posteriormente, el primer conjunto de reacciones se lavó inmediatamente en la placa filtrante a 4°C sin ningún lavado adicional. Al contrario de Wallace *et al* (2005), el tampón de lavado se añadió tras transferir las muestras a la placa filtrante.

5 Se investigó el efecto de un procedimiento de lavado por dilución directa e indirecta adicional inmediatamente después de la etapa de hibridación de la siguiente manera. Para los procedimientos directo e indirecto, se usó un tampón de lavado (3 x SSC/Sarkosyl al 0,1%/1 mg/ml de caseína. Se trata del tampón de lavado riguroso) a 50°C.

El segundo conjunto de perlas se lavó mediante el procedimiento directo. El procedimiento directo comprende una dilución de la mezcla de hibridación (50 µl) con 200 µl de tampón de lavado a temperatura de hibridación en el termociclador seguida de una transferencia de toda la muestra diluida a la placa filtrante.

10 Se lavó la tercera reacción de hibridación mediante el procedimiento indirecto. El procedimiento indirecto comprende una dilución mediante una transferencia rápida de 50µl de la mezcla de hibridación a la placa filtrante que se ha llenado previamente con 200 µl de tampón de lavado a la temperatura de hibridación (véase también Wallace *et al*, 2005).

**Resultados:**

15 Los resultados se muestran en la Tabla 6d. Ambos procedimientos de lavado adicionales producen una disminución de la señal absoluta en comparación con el procedimiento estándar, pero al mismo tiempo, la especificidad de la señal aumenta significativamente. No se produjeron diferencias significativas entre los procedimientos de lavado directo e indirecto. En la práctica, el lavado mediante dilución directa en el termociclador es menos práctico y, por tanto, se prefiere el procedimiento de lavado mediante dilución indirecta.

**Conclusión:**

El uso de una etapa adicional de lavado por dilución tras la hibridación tiene un efecto positivo significativo sobre la especificidad de la señal. Por razones prácticas, se prefiere el procedimiento de lavado por dilución indirecta.

**Ejemplo 4**

**Objetivo:**

25 Examinar si el mantenimiento de la temperatura de hibridación durante el lavado riguroso antes de la incubación con estreptavidina-R-ficoeritrina tiene un efecto positivo relevante en la especificidad de la señal.

**Introducción:**

30 El efecto negativo de la caída de la temperatura tras una hibridación rigurosa, como se describe anteriormente, implica que la temperatura del propio lavado riguroso también puede influir. Por lo tanto, se investigó el efecto de las temperaturas de los lavados rigurosos a 50°C, T.A. o 4°C.

**Materiales y procedimientos:**

Se investigó el efecto de diferentes temperaturas del tampón de lavado riguroso tras la etapa de hibridación antes de la incubación con estreptavidina-R-ficoeritrina usando el sistema de modelo SPF<sub>10</sub> de la siguiente manera.

35 Para investigar este efecto, se usó una perla Luminex™ que portaba una sonda para HPV 31 (nombre: 31SLPr31, véase la Tabla 7a). Esta sonda es específica de la identificación de las secuencias del HPV 31 amplificadas con el conjunto de cebadores SPF<sub>10</sub>. Para observar la posible reactividad cruzada con 31SLPr31, se usaron amplímeros de HPV44 y HPV 16. Las secuencias diana de HPV 31 y HPV 44 y 16 difieren en 1 y 4 posiciones, respectivamente (Tabla 7b).

40 La hibridación se realizó a 50°C. Posteriormente, se transfirió el conjunto de reacciones a una placa filtrante que contenía tampón de lavado a 50°C, T.A. o 4°C, respectivamente.

**Resultados:**

45 Los resultados se muestran en la Tabla 7c. El nivel absoluto de la señal del control positivo no difiere entre 50°C y la T.A., y disminuye ligeramente tras el lavado a 4°C. Sin embargo, el lavado a 50°C produce un aumento significativo de la especificidad de la señal, mientras que el lavado a T.A. o a 4°C produce una disminución de la especificidad de la señal. Por lo tanto, se prefiere un procedimiento de lavado por dilución indirecta a la temperatura de hibridación de 50°C.

**Conclusión:**

El mantenimiento de la temperatura de hibridación durante el lavado riguroso antes de la incubación con estreptavidina-R-ficoeritrina tiene un efecto relevante sobre la especificidad de la señal.

**Ejemplo 5****Objetivo:**

Examinar si el uso de un termomezclador tiene un efecto positivo relevante sobre la intensidad de la señal.

**Introducción:**

5 La cinética de la reacción de hibridación se puede influir mediante la mezcla de componentes durante la reacción.

Por lo tanto, se investigó la influencia de usar un termomezclador durante la hibridación.

**Materiales y procedimientos:**

El efecto de la cinética de difusión con un termomezclador durante la hibridación se investigó usando el sistema de modelo MPF de la siguiente manera.

10 Se usaron dos perlas Luminex™, cada una de las cuales portaba una sonda para HPV 18 (nombre: 18MLPr7, véase la Tabla 8a) o HPV51 (nombre: 51MLPr2, véase la Tabla 8a). Estas sondas son específicas de la identificación de las secuencias de HPV18 y HPV51 amplificadas con el conjunto de cebadores de MPF.

Se mezclaron las dos perlas y se hibridaron con amplímeros de MPF de HPV 18 y HPV 51. Las secuencias diana del HPV 18 y HPV 51 difieren en 7 posiciones (Tabla 8b y c). Las reacciones se analizaron por duplicado.

15 Se desnaturizó una reacción y se hibridó en un termociclador sin agitación (véase también Wallace *et al.*, 2005).

Para la desnaturalización, se desnaturizó la reacción por duplicado en un termociclador y, para la hibridación, se transfirió inmediatamente a un termomezclador. La hibridación se realizó a 50°C. Posteriormente, se lavaron las perlas inmediatamente en la placa filtrante a 50°C usando el protocolo optimizado de hibridación y lavado.

20 **Resultados:** Los resultados se muestran en la Tabla 8d. El uso de un termomezclador aumenta significativamente la señal absoluta del control positivo, mientras que el fondo permanece invariable. Esto produjo un aumento global de la especificidad de la señal.

Estos resultados demuestran que la intensidad de la señal aumentará (mejorará) usando un termomezclador.

**Conclusión:**

El uso de un termomezclador tiene un efecto positivo relevante sobre la intensidad y la especificidad de la señal.

25 **Ejemplo 6****Objetivo:**

Examinar si la incubación con estreptavidina-R-ficoeritrina a la temperatura de hibridación tiene un efecto positivo relevante sobre la intensidad de la señal.

**Introducción:**

30 En general, la temperatura afecta a la cinética de cualquier reacción, incluyendo la detección de híbridos con PE indicadora. Por lo tanto, se investigó la influencia de la temperatura para la incubación con PE y el posterior lavado.

**Materiales y procedimientos:**

35 Se usaron perlas Luminex™ que portaban una sonda para HPV51 (nombre: 51SLPr2, véase la Tabla 9a). Esta sonda es específica de la identificación de las secuencias del HPV51 amplificadas con el conjunto de cebadores SPF<sub>10</sub>. Para observar la posible reactividad cruzada con esta sonda, se usaron amplímeros SPF<sub>10</sub> de HPV33 y HPV16. Las secuencias diana de HPV 51, HPV33 y HPV16 difieren en 4 posiciones (Tabla 9b).

40 La hibridación se realizó a 50°C en dos duplicados usando el protocolo optimizado de hibridación y lavado descrito en la presente memoria. Tras un lavado riguroso, se incubó un conjunto de reacciones con PE a 50°C (véase también Wallace *et al.*, 2005) y el otro conjunto se incubó con PE a T.A. Posteriormente, se lavaron las perlas en una placa filtrante a 50°C.

En otro experimento, la hibridación se realizó a 50°C en dos duplicados usando el protocolo optimizado de hibridación y lavado. Tras un lavado riguroso, se incubaron todas las reacciones con PE a 50°C (véase también Wallace *et al.*, 2005). Tras la incubación con PE a 50°C, se lavó un conjunto de reacciones a 50°C (véase también Wallace *et al.*, 2005) y se lavó el conjunto duplicado a T.A.

45

**Resultados:**

La incubación con PE a diferentes temperaturas tuvo un efecto significativo como se muestra en la Tabla 9c. La incubación con PE a la temperatura de hibridación de 50°C produce señales absolutas más elevadas en comparación con la incubación con PE a T.A. En cualquiera caso, la especificidad de la señal no difirió significativamente.

- 5 Por lo tanto, se prefiere la incubación con estreptavidina-R-ficoeritrina a la temperatura de hibridación. Por el contrario, el lavado a T.A. o a temperatura de hibridación tras la incubación no tuvo un efecto relevante, aunque esto puede ser más práctico en algunas situaciones.

La influencia de la temperatura sobre la etapa de lavado tras la incubación con PE no es relevante. Tanto la señal absoluta como la especificidad parecen no afectarse por la temperatura del lavado.

10 **Conclusión:**

El mantenimiento de la temperatura de hibridación durante la incubación con estreptavidina-R-ficoeritrina tiene un efecto relevante en la intensidad de la señal, pero no en la especificidad de la señal. La temperatura del lavado tras la incubación con PE no tiene un efecto relevante.

**Ejemplo 7**15 **Objetivo:**

Examinar si se puede evitar la obstrucción de la sonda de muestreo Luminex™ mediante un lavado final con 1 x SSC.

**Introducción:**

- 20 En el protocolo optimizado de hibridación y lavado de la presente invención, la hibridación se realiza en 3 x SSC. A esta concentración, SSC sí obstruye la sonda de muestreo Luminex™, obstruyendo seriamente el procesamiento de las muestras. Por lo tanto, se investigó la influencia de una concentración de SSC inferior para un lavado final.

**Resultados:**

- 25 Inicialmente, se intentó mantener la concentración de SSC de la hibridación. Sin embargo, como el lavado final con 3 x SSC introdujo una gran obstrucción de la sonda de muestreo Luminex™, no se pudieron generar datos relevantes. La realización de esta etapa de lavado simplemente con 1 x SSC produjo datos relevantes. Por lo tanto, debido a la falta de datos, no se puede mostrar una comparación de los datos. No se han investigado otras concentraciones de SSC.

**Conclusión:**

Un lavado final con 1 x SSC evita la obstrucción de la sonda de muestreo Luminex™.

**Ejemplo 8****Objetivo:**

- 30 Examinar si el almacenamiento tras el último lavado a 4°C durante al menos 4 días de las muestras que están preparadas para la medición tiene algún efecto relevante sobre la señal.

**Introducción:**

- 35 Para aumentar la flexibilidad en el flujo de trabajo, se analizaron varias etapas con respecto al protocolo de prueba de hibridación directa usando el sistema Luminex™. Un procedimiento analizado en particular es el almacenamiento entre dos etapas del procedimiento de hibridación directa. Por lo tanto, se investigó la influencia del almacenamiento a 4°C.

**Materiales y procedimientos:**

Se investigó el efecto del almacenamiento a 4°C tras el procedimiento de lavado final usando el sistema de modelo SPF10 de la siguiente manera.

- 40 Para investigar este efecto, se usaron perlas Luminex™ que portaban una sonda para HPV51 (nombre: 51SLPr2, véase la Tabla 10a). Esta sonda es específica de la identificación de las secuencias del HPV51 amplificadas con el conjunto de cebadores SPF<sub>10</sub>. Para observar la posible reactividad cruzada con 51SLPr2, se usaron amplímeros de HPV31. Las secuencias diana de HPV 51 y HPV31 difieren en 4 posiciones (Tabla 10b).

- 45 Tras el procedimiento de lavado final, se almacenaron conjuntos de reacciones a 4°C durante 0, 4, 24 y 96 horas, respectivamente. A continuación, se midieron estos conjuntos de reacciones a T.A.

**Resultados:**

Los resultados se muestran en la Fig. 10c. Como se demuestra, el almacenamiento tras la etapa de lavado final no afecta a la intensidad ni a la especificidad de la señal. No obstante, el almacenamiento como tal parece introducir una mejora muy ligera en la intensidad de la señal bruta a lo largo del tiempo. Por lo tanto, es posible introducir un almacenamiento tras la etapa de lavado final, si es necesario, durante un máximo de 4 días, manteniendo la señal original.

**Conclusión:**

El almacenamiento tras la etapa de lavado final no tiene un efecto relevante sobre la intensidad ni la especificidad de la señal, aumentando la flexibilidad del flujo de trabajo.

**10 Diseño de la sonda (espaciador) - Introducción**

El principio clave del sistema Luminex™ consiste en la inmovilización de la sonda de oligonucleótido específica sobre la superficie de una microperla, que sirve como un único marcador, debido a la composición de color de cada tipo de perla.

A escala molecular, la perla es de un tamaño mucho mayor que la sonda de oligonucleótido específica. Por consiguiente, la secuencia de sonda específica se coloca muy cerca de la superficie de la perla Luminex™. Esta ubicación de la sonda puede no ser óptima para la cinética de la hibridación entre la sonda inmovilizada y las moléculas diana en disolución, debido a la hidrancia estérica y a diversos efectos de la superficie de la perla, tales como la hidrofobicidad superficial.

Los siguientes ejemplos describen una serie de enfoques para cambiar la situación de la sonda sobre la superficie de la perla con el fin de optimizar la cinética de hibridación entre la sonda y la diana.

Se analizaron las siguientes variantes del diseño de la sonda:

1. Uso de un espaciador de carbono de longitud variable.
2. Uso de un espaciador de oligonucleótido adicional de longitud variable.
3. Uso de un espaciador de oligonucleótido de composición variable.

La sonda tiene tres regiones distintas con diferentes funciones:

1. el grupo de acoplamiento, tal como un grupo NH<sub>2</sub>, que permite el acoplamiento covalente de la sonda con la superficie de la perla;
2. el espaciador, que puede servir (a) para crear una distancia entre la superficie de la perla y la secuencia de la sonda específica y/o (b) colocar la sonda específica más en un medio hidrófilo; y
3. la secuencia de la sonda específica de la diana real. Para esta parte de la sonda, se aplican los parámetros normales en la técnica, tales como la composición y la longitud de la sonda.

**Ejemplo 9****Objetivo:**

Determinar el efecto del uso de un espaciador de carbono de longitud variable.

**35 Materiales y procedimientos:**

Se usaron perlas Luminex™, cada una de las cuales portaba una sonda para HPV51 con un espaciador C<sub>12</sub> (nombre: 51SLPr2, véase la Tabla 11a) o un espaciador C<sub>18</sub> (nombre: 51SLPr2C<sub>18</sub>, véase la Tabla 11a). Estas sondas son específicas de la identificación de las secuencias de HPV51 amplificadas con el conjunto de cebadores de SPF<sub>10</sub>. Para observar la posible reactividad cruzada con estas sondas, se usaron amplímeros de HPV33. Las secuencias diana de HPV 51 y HPV33 difieren en 4 posiciones (Tabla 11b).

**Resultados:** los resultados se muestran en la Tabla 11c. Un espaciador C<sub>18</sub> produjo una disminución de la señal absoluta, pero la especificidad fue superior en comparación con la sonda C<sub>12</sub>. Este fenómeno no sólo se observó para 51SLPr2C<sub>18</sub>, sino también para otras sondas con un espaciador C<sub>18</sub> (p.ej., 33SLPr21 C<sub>18</sub>: Tabla 11a, c y d).

**Conclusión:**

El uso de diferentes longitudes de espaciadores de carbono tiene un efecto relevante en la especificidad de la señal. Con respecto al ejemplo 51SLPr2, la mejor sonda contiene un espaciador de carbono C<sub>18</sub>.

**Ejemplo 10****Objetivo:**

Determinar el efecto de un espaciador de oligonucleótido de longitud variable.

**Materiales y procedimientos:**

5 Se usaron perlas Luminex™, cada una de las cuales portaba una sonda para HPV51 con un espaciador de 0, 10, 20, 30 ó 40 timinas (nombre: 51SLPr2, 51SLPr2T10, 51SLPr2T20, 51SLPr2T30, 51SLPr2T40, véase la Tabla 12a). Cada tipo de perla portaba una variante de perla distinta. Estas sondas son específicas de la identificación de las secuencias de HPV51 amplificadas con el conjunto de cebadores de SPF<sub>10</sub>. Para observar la posible reactividad cruzada con estas sondas, se usaron amplímeros de HPV33. Las secuencias diana de HPV51 y HPV33 difieren en 4 posiciones (Tabla 12c).

10 Aparte del sistema de modelo SPF<sub>10</sub>, también se estudió este efecto usando un sistema de modelo MPF de la siguiente manera. Se usaron perlas Luminex™, cada una de las cuales portaba una sonda para HPV52 con un espaciador de 0, 20, 30 ó 40 timinas (nombre: 52MLPr2, 52MLPr2T20, 52MLPr2T30, 52MLPr2T40, véase la Tabla 12b). Cada tipo de perla portaba una variante de perla distinta. Estas sondas son específicas de la identificación de las secuencias de HPV52 amplificadas con el conjunto de cebadores de MPF. Para observar la posible reactividad cruzada con estas sondas, se usaron amplímeros de HPV16. Las secuencias diana de HPV52 y HPV16 difieren en 2 posiciones (Tabla 12d).

**Resultados:**

20 Los resultados se muestran en la Tabla 12e y 12f. El alargamiento del espaciador con un tramo de timinas aumentó significativamente el nivel de señal absoluta. Además, se aumenta significativamente la especificidad en comparación con un espaciador sin un espaciador de timina adicional. Comparando los espaciadores con diferentes longitudes, se requiere un mínimo de 20 residuos de timina para producir una señal óptima (p.ej., 51SLPr2). En términos generales, las sondas funcionan mejor cuando contienen un espaciador de 40 nucleótidos (p.ej., 51SLPr2 y 52MLPr2). Por lo tanto, se prefiere esta longitud de espaciador.

**Conclusión:**

25 El uso de diferentes espaciadores tiene un efecto relevante no sólo sobre la intensidad de la señal, sino también sobre la especificidad. Con respecto a 51SLPr2<sub>n</sub>, una buena sonda contiene un espaciador de al menos 20 nucleótidos de timina que aumenta tanto la intensidad como la especificidad de la señal. En general, las longitudes de los espaciadores de al menos 40 nucleótidos funcionan mejor.

**Ejemplo 11:****Objetivo:**

Determinar si el uso de un espaciador poli(T) modificado puede evitar un falso positivo de reactividad.

**Introducción:**

35 Es ampliamente sabido que muchas ADN polimerasas de Taq añaden un nucleótido A adicional al extremo 3' de una cadena sintetizada. No se sabe si también es posible añadir múltiples A al extremo 3', generando así una subpoblación de moléculas con una cola oligo-A en el extremo 3'. Aunque dichas moléculas sólo representarán una proporción muy pequeña de la cantidad total del producto de PCR, estas moléculas pueden generar un resultado falso negativo debido a la elevada sensibilidad del procedimiento de detección. Esto se debe a la hibridación entre dichos tramos de oligo-A en el producto de PCR y al espaciador poli(T) de la sonda.

40 Este artefacto de PCR se produce en algunas muestras y es complicado reproducirlo al nivel de la PCR. Parece depender de fluctuaciones muy ligeras de las condiciones de reacción. El fondo es muy reproducible al nivel de detección, es decir, un producto de PCR que genere fondo lo hará de una manera muy reproducible.

45 Este artefacto de PCR también puede provocar resultados falsos positivos en un sistema de ensayo de sonda lineal (LiPA), pues este sistema también comprende sondas con cola T. En un ensayo LiPA, esto produce una señal (fondo) débil igual con todas las sondas, independientemente de su secuencia específica. También se han observado dichas lecturas de señales de fondo débiles en el sistema Luminex™. Por lo tanto, se investigó el efecto de un espaciador modificado.

**Materiales y procedimientos:**

50 Se usaron perlas Luminex™, cada una de las cuales portaba una sonda para HPV 18 con un espaciador T40 o un espaciador (TTG)<sub>13</sub> modificado (nombre: 18MLPr7T40 y 18MLPr7(TTG)<sub>13</sub>, véase la Tabla 13a). Estas sondas son específicas de la identificación de las secuencias de HPV 18 amplificadas con el conjunto de cebadores de MPF.

Se seleccionó el triplete (TTG) como espaciador alternativo, porque muestra una de las peores eficiencias de unión teóricas con poli(A).

Para observar la posible reactividad cruzada con 18MLPr7T40 y 18MLPr7(TTG)<sub>13</sub>, se usaron amplímeros obtenidos de las muestras que presentaron este fondo falso positivo (designados nc8).

## 5 Resultados:

En la Tabla 13b, se muestran los resultados.

Un espaciador de tripletes de 13 tripletes de nucleótidos "TTG" fue claramente capaz de eliminar casi por completo la señal de fondo que se observó para el espaciador T40.

## Conclusión:

- 10 El uso de un espaciador basado en T alternativo, tal como (TTG)<sub>13</sub> tiene un efecto positivo relevante sobre la especificidad de la señal, eliminando las señales de falso positivo inducidas por artefactos de PCR ricos en A.

## Ejemplo 12

### Objetivo:

- 15 Examinar si la colocación de un espaciador basado en timinas bien en el extremo 5' o en el extremo 3' de la sonda prohíbe la unión con una región diana rica en A que flanquea el sitio de unión de sonda-diana.

### Introducción:

- 20 Se sabe que los apareamientos erróneos en la mitad de una sonda/diana tienen el mayor impacto sobre la energía de unión. Los apareamientos erróneos cerca de los lados de la región de unión son más difíciles de distinguir. En combinación con la posición de tramos ricos en A que flanquean la región de unión de sonda-diana, esto puede dañar la fuerza selectiva de una sonda. Por lo tanto, se investigó la influencia de la posición del espaciador para minimizar su unión con una región diana rica en A que flanquee la zona de unión sonda-diana.

### Materiales y procedimientos:

- 25 Se investigó el efecto de la posición de un espaciador bien en el extremo 5' o en el extremo 3' de una sonda, situado entre la perla Luminex™ y la secuencia de sonda específica usando el sistema de modelo MPF de la siguiente manera.
- 30 Para investigar este efecto, se usaron perlas Luminex™, cada una de las cuales portaba una sonda para HPV 18 y HPV45 con un espaciador basado en timinas (nombre: 18MLPr7T40N5, 18MLPr7T40N3, 45MLPr8T40N5 y 45MLPr8T40N3, véase la Tabla 14a). Estas sondas son específicas de la identificación de las secuencias de HPV 18 y HPV45 amplificadas con el conjunto de cebadores de MPF, respectivamente. Para observar la posible reactividad cruzada con 18MLPr7T40<sub>n</sub>, se usaron amplímeros de HPV39. Las secuencias diana de HPV18 y HPV39 difieren en 2 posiciones (Tabla 14b). Para observar la posible reactividad cruzada con 45MLPr8T40<sub>n</sub>, se usaron amplímeros de HPV13, 39 y 40. Las secuencias diana de HPV45 y HPV13, 39 y 40 difieren en 3, 2 y 1 posiciones, respectivamente (Tabla 14c).

### Resultados:

- 35 Los resultados se muestran en la Tabla 14d. Según lo demostrado, un espaciador en el extremo 3' de una sonda en lugar de en el extremo 5' disminuye su unión con una región diana rica en A que flanquee el sitio de unión de sonda-diana, afectando a la energía de unión (dG) y a la temperatura de fusión (Tf). La exclusión de estas señales inespecíficas se pueden explicar mediante la unión de la diana con el espaciador y la sonda. Estos resultados sugieren que la unión de una diana con un espaciador puede dañar la especificidad de la sonda, lo que se debe evitar. En principio, puede haber un mecanismo similar implicado usando un espaciador de tripletes de nucleótidos "TTG". Por lo tanto, cuando se usa un espaciador basado en timinas, es posible aumentar la estabilidad del híbrido sonda:diana mediante una débil hibridación cruzada entre el espaciador y las secuencias adyacentes a la región diana específica, dando como resultado una señal de falso positivo que se debería tener en cuenta para el diseño de la sonda.

### Conclusión:

- 45 La colocación de un espaciador basado en timinas bien en el extremo 5' o en el extremo 3' de la sonda puede tener un efecto relevante sobre la unión con una región diana rica en A que flanquee el sitio de unión de sonda-diana.

### Referencias bibliográficas:

Cowan L. S., Diem L., Brake M. C., Crawford J. T. "Related Articles. Transfer of a Mycobacterium tuberculosis genotyping method, Spoligotyping, from a reverse line-blot hybridization, membrane-based assay to the Luminex multianalyte profiling system". *J. Clin Microbiol.*, enero de 2004; 42(1):474-7.

Dunbar S. A. "Applications of Luminex™(R) xMAPtrade mark technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection". *Clin. Chim. Acta.*, 12 de agosto de 2005; [Publicación electrónica previa a la impresión].

5 Taylor J. D., Briley D., Nguyen Q., Long K., Iannone M. A., Li M. S., Ye F., Afshari A., Lai E., Wagner M., Chen J., Weiner M. P. "Flow cytometric platform for high-throughput single nucleotide polymorphism analysis". *Biotechniques*. Marzo de 2001;30 (3):661-6, 668-9.

de Villiers E. M., Fauquet C., Broker T. R., Bernard H. U., zur Hausen H. "Classification of papillomaviruses". *Virology*, 20 de junio de 2004;324(1):17-27. Revisión.

Wallace J., Woda B. A., Pihan G. "Facile, comprehensive, high-throughput genotyping of human genital papillomaviruses using spectrally addressable liquid bead microarrays". *J. Mol. Diagn.*, febrero de 2005; 7(1):72-80.

10 **Ejemplo 2 de tablas:**

**Tabla 5a.** 31SLPr31 = versión 31 de la sonda de SPF<sub>10</sub> 31; C<sub>12</sub> = un tramo de 12 átomos de carbono

Nombre	Composición de la sonda
31SLPr31	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -GGCAATCAGTTATTTG [SEC ID N.º: 119]

**Tabla 5b.** Los nucleótidos idénticos están indicados por "-"

Diana	Alineamiento con la sonda 31SLPr31	Número de apareamientos erróneos
HPV 31	GGCAATCAGTTATTTG [SEC ID N.º: 119]	0
HPV 44	--A----- [SEC ID N.º: 120]	1
HPV 16	--T-C-AC-----[SEC ID N.º: 121]	4

**Tabla 5c**

Sonda	hibridada a diana	Temperatura tras hibridación (°C)	Señal (IFM)	diana / sonda (%)	Señal/ruido	Observación	Ej.
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV31	50	4457	100	48	Específica	ID28
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV44	50	1279	29	14	Reacción cruzada	ID28
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV16	50	19	<1	<1	Negativa	ID28
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV31	T.A.	7544	100	13	Específica	ID27
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV44	T.A.	3783	50	6	Reacción cruzada	ID27
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV16	T.A.	24	1	<1	Negativa	ID27

15

**Ejemplo 3 de tablas:**

**Tabla 6a.** 31 SLPr31 = versión 31 de la sonda de SPF<sub>10</sub> 31; C<sub>12</sub> = un tramo de 12 átomos de carbono

Nombre	Composición de la sonda
31SLPr31	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -GGCAATCAGTTATTTG [SEC ID N.º: 119]
51SLPr2	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -CTATTTGCTGGAACAATC [SEC ID N.º: 122]

**Tabla 6b.** Los nucleótidos idénticos están indicados por un "-".

Diana	Alineamiento con la sonda 31SLPr31	Número de apareamientos erróneos
HPV 31	GGCAATCAGTTATTTG [SEC ID N.º: 119]	0
HPV 44	--A [SEC ID N.º: 120]	1
HPV 16	--T-C-AC-----[SEC ID N.º: 121]	4

5

**Tabla 6c.** Los nucleótidos idénticos están indicados por un "-".

Diana	Alineamiento con la sonda 51SLPr2	Número de apareamientos erróneos
HPV 51	CTATTTGCTGGAACAATC [SEC ID N.º: 122]	0
HPV 33	T-----T—GG-----[SEC ID N.º: 123]	4
HPV 16	-----T—GGT--C- [SEC ID N.º: 124]	5

**Tabla 6d**

Sonda	hibridada a la diana	Proced. de lavado adicional	Señal (IFM)	diana / sonda (%)	Señal/ruido	Observación	Ej.
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV31	Ninguno	4457	100	48	Específica	ID28
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV44	Ninguno	1279	29	14	Reacción cruzada	ID28
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV16	Ninguno	19	<1	<1	Negativa	ID28
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV31	Directo	2765	100	41	Específica	ID31
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV44	Directo	117	4	2	Negativa	ID31
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV16	Directo	20	1	<1	Negativa	ID31
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV31	Indirecto	3843	100	171	Específica	ID32
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV44	Indirecto	25	1	1	Negativa	ID32
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV16	Indirecto	15	<1	1	Negativa	ID32
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV51	Ninguno	2316	100	201	Específica	ID28
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV33	Ninguno	631	27	55	Reacción cruzada	ID28

51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV16	Ninguno	11	<1	1	Negativa	ID28
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV51	Directo	2057	100	110	Específica	ID31
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV33	Directo	432	21	23	Reacción cruzada	ID31
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV16	Directo	18	1	1	Negativa	ID31
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV51	Indirecto	1571	100	209	Específica	ID32
<b>Sonda</b>	<b>hibridada a la diana</b>	<b>Proced. de lavado adicional</b>	<b>Señal (IFM)</b>	<b>diana / sonda (%)</b>	<b>Señal/ruido</b>	<b>Observación</b>	<b>Ej.</b>
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV33	Indirecto	354	23	47	Reacción cruzada	ID32
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV16	Indirecto	7	<1	1	Negativa	ID32

**Ejemplo 4 de tablas:**

**Tabla 7a.** 31SLPr31 = versión 31 de la sonda de SPF<sub>10</sub> 31; C<sub>12</sub> = un tramo de 12 átomos de carbono

Nombre	Composición de la sonda
31SLPr31	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -GGCAATCAGTTATTTG [SEC ID N.º: 119]

5

**Tabla 7b.** Los nucleótidos idénticos están indicados por un "-".

Diana	Alineamiento con la sonda 31SLPr31	Número de apareamientos erróneos
HPV 31	GGCAATCAGTTATTTG [SEC ID N.º: 119]	0
HPV 44	--A----- [SEC ID N.º: 120]	1
HPV 16	--T-C-AC----- [SEC ID N.º: 121]	4

Tabla 7c

Sonda	hibridada a la diana	Temp. de lavado (°C)	Señal (IFM)	diana / sonda (%)	Señal/ruido	Observación	Ej.
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV31	50	5747	100	162	Específica	ID90
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV44	50	56	1	2	Negativa	ID90
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV16	50	20	<1	<1	Negativa	ID90
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV31	T.A.	5701	100	33	Específica	ID86
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV44	T.A.	2422	42	14	Reacción cruzada	ID86
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV16	T.A.	13	<1	<1	Negativa	ID86
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV31	4	4889	100	44	Específica	ID34
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV44	4	417	9	4	Reacción cruzada	ID34
31SLPr31	SPF <sub>10</sub> HPV16	4	33	1	<1	Negativa	ID34

**Ejemplo 5 de tablas:**

Tabla 8a. 18MLPr7 = versión 7 de la sonda de MPF 18; C<sub>12</sub> = un tramo de 12 átomos de carbono

Nombre	Composición de la sonda
18MLPr7T40	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -(T) <sub>40</sub> -TTACATAAGGCACAGG [SEC ID N.º: 125]
51 MLPr2T40	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -(T) <sub>40</sub> -TTATTGGCTCCACCGT [SEC ID N.º: 126]

5

Tabla 8b. Los nucleótidos idénticos están indicados por un "-".

Diana	Alineamiento con la sonda 18MLPr7	Número de apareamientos erróneos
HPV18	TTACATAAGGCACAGG [SEC ID N.º: 127]	0
HPV51	C-C--CCGT—G---- [SEC ID N.º: 128]	7

Tabla 8c. Los nucleótidos idénticos están indicados por un "-".

Diana	Alineamiento con la sonda 51MLPr2	Número de apareamientos erróneos
HPV51	TTATTGGCTCCACCGT [SEC ID N.º: 70]	0
HPV18	A-----T-A--TAAG [SEC ID N.º: 129]	7

10

Tabla 8d

Sonda	hibridada a la diana	Proced. de hibridación	Señal (IFM)	diana / sonda (%)	Señal/ruido	Observación	Ej.
18MLPr7T40	MPF HPV 18	Termociclador	1082	100	144	Específica	ID 148
18MLPr7T40	MPF HPV51	Termociclador	6	1	1	Negativa	ID148
51MLPr2T40	MPF HPV51	Termociclador	1410	100	123	Específica	ID 148
51MLPr2T40	MPF HPV18	Termociclador	20	1	1	Negativa	ID 148
18MLPr7T40	MPF HPV 18	Termomezclador	2154	100	287	Específica	ID 148
18MLPr7T40	MPF HPV51	Termomezclador	6	0	1	Negativa	ID148
51MLPr2T40	MPF HPV51	Termomezclador	2725	100	210	Específica	ID 148
51MLPr2T40	MPF HPV18	Termomezclador	25	1	2	Negativa	ID 148

**Ejemplo 6 de tablas:**

5 **Tabla 9a.** 51SLPr2 = versión 2 de la sonda de SPF<sub>10</sub> 51; C<sub>12</sub> = un tramo de 12 átomos de carbono

Nombre	Composición de la sonda
51SLPr2	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -CTATTTGCTGGAACAATC [SEC ID N.º: 122]

**Tabla 9b.** Los nucleótidos idénticos están indicados por un "-".

Diana	Alineamiento con la sonda 51SLPr2	Número de apareamientos erróneos
HPV 51	CTATTTGCTGGAACAATC [SEC ID N.º: 122]	0
HPV 33	T-----T---GG----- [SEC ID N.º: 123]	4
HPV 16	-----T---GGT--C-[SEC ID N.º: 124]	5

**Tabla 9c**

Sonda	hibridada a la diana	Temp. de inc. con PE (°C)	Señal (IFM)	diana / sonda (%)	Señal/ruido	Observación	Ej.
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV51	50	3681	100	194	Específica	ID44
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV33	50	345	9	18	Reacción cruzada	ID44
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV16	50	30	1	2	Negativa	ID44
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV51	T.A.	3074	100	615	Específica	ID43
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV33	T.A.	259	8	52	Reacción cruzada	ID43
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV16	T.A.	5	<1	1	Negativa	ID43

**Tabla 9d**

Sonda	hibridada a la diana	Temp. de lavado (°C)	Señal (IFM)	diana / sonda (%)	Señal/ruido	Observación	Ej.
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV51	50	2433	100	187	Específica	ID90
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV33	50	423	16	33	Reacción cruzada	ID90
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV16	50	8	<1	1	Negativa	ID90
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV51	T.A.	2777	100	179	Específica	ID90
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV33	T.A.	374	13	24	Reacción cruzada	ID90
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV16	T.A.	10	<1	1	Negativa	ID90

5 **Ejemplo 8 de tablas:**

**Tabla 10a.** 51SLPr2 = versión 2 de la sonda de SPF<sub>10</sub> 51; C<sub>12</sub> = un tramo de 12 átomos de carbono

Nombre	Composición de la sonda
51SLPr2	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -CTATTTGCTGGAACAATC [SEC ID N.º: 122]

**Tabla 10b.** Los nucleótidos idénticos están indicados con un “-”

Diana	Alineamiento con la sonda 51SLPr2	Número de apareamientos erróneos
HPV51	CTATTTGCTGGAACAATC [SEC ID N.º: 122]	0
HPV 31	T-----T---GG----- [SEC ID N.º: 123]	4

Tabla 10c

Sonda	hibridada a la diana	Almacenamiento a 4°C (h)	Señal (IFM)	diana / sonda (%)	Señal/ruido	Observación	Ej.
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV51	0	1573	100	51	Específica	ID110
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV31	0	30	2	1	Negativa	ID110
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV51	4	1611	100	59	Específica	ID111
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV31	4	28	2	1	Negativa	ID111
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV51	24	1783	100	60	Específica	ID113
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV31	24	34	2	1	Negativa	ID 113
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV51	96	1707	100	52	Específica	ID114
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV31	96	33	2	1	Negativa	ID114

**Ejemplo 9 de tablas:**

**Tabla 11a.** 51SLPr2 = versión 2 de la sonda de SPF<sub>10</sub> 51; C<sub>12</sub> = un tramo de 12 átomos de carbono; C<sub>18</sub> = un tramo de 18 átomos de carbono

5

Nombre	Composición de la sonda
51SLPr2	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -CTATTTGCTGGAACAATC [SEC ID N.º: 122]
51SLPr2C <sub>18</sub>	NH <sub>2</sub> -C <sub>18</sub> -CTATTTGCTGGAACAATC [SEC ID N.º: 122]
33SLPr21	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -GGGCAATCAGGTATT [SEC ID N.º: 130]
33SLPr21C <sub>18</sub>	NH <sub>2</sub> -C <sub>18</sub> -GGGCAATCAGGTATT [SEC ID N.º: 130]

**Tabla 11b.** Los nucleótidos idénticos están indicados por un "-".

Diana	Alineamiento con la sonda 51SLPr2	Número de apareamientos erróneos
HPV 51	CTATTTGCTGGAACAATC [SEC ID N.º: 122]	0
HPV 33	T-----T---GG----- [SEC ID N.º: 123]	4

**Tabla 11c.** Los nucleótidos idénticos están indicados por un "-".

Diana	Alineamiento con la sonda 33SLPr21	Número de apareamientos erróneos
HPV 33	GGGCAATCAGGTATT [SEC ID N.º: 130]	0
HPV 51	-AA ----- C-T-- [SEC ID N.º: 131]	4

10

Tabla 11d

Sonda	hibridada a la diana	Señal (IFM)	diana / sonda (%)	Señal/ruido	Observación	Ej.
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV51	4291	100	172	Específica	ID64
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV33	358	8	14	Reacción cruzada	"
51SLPr2C18	SPF <sub>10</sub> HPV51	3515	100	216	Específica	ID67
51SLPr2C18	SPF <sub>10</sub> HPV33	16	0	1	Negativa	"
33SLPr21	SPF10 HPV33	429	100	48	Específica	ID77
33SLPr21	SPF10 HPV51	52	12	6	Reacción cruzada	"
33SLPr21C18	SPF10 HPV33	429	100	61	Específica	"
33SLPr21C18	SPF10 HPV51	4	1	1	Negativa	"

**Ejemplo 10 de tablas:**

5 **Tabla 12a.** 51SLPr2 = versión 2 de la sonda de SPF<sub>10</sub> 51; C<sub>12</sub> = un tramo de 12 átomos de carbono; (T)<sub>40</sub> = un tramo de 40 nucleótidos de timina

Nombre	Composición de la sonda
51SLPr2	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -CTATTTGCTGGAACAATC [SEC ID N.º: 122]
51SLPr2T10	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -(T) <sub>10</sub> -CTATTTGCTGGAACAATC [SEC ID N.º: 132]
51 SLPr2T20	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -(T) <sub>20</sub> -CTATTTGCTGGAACAATC [SEC ID N.º: 133]
51SLPr2T30	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -(T) <sub>30</sub> -CTATTTGCTGGAACAATC [SEC ID N.º: 134]
51 SLPr2T40	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -(T) <sub>40</sub> -CTATTTGCTGGAACAATC [SEC ID N.º: 135]

**Tabla 12b.** 52MLPr2 = versión 2 de la sonda de MPF 52; C<sub>12</sub> = un tramo de 12 átomos de carbono; (T)<sub>40</sub> = un tramo de 40 nucleótidos de timina

Nombre	Composición de la sonda
52MLPr2	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -CCGTACTGGTTACAACGA [SEC ID N.º: 73]
52MLPr2T20	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -(T) <sub>20</sub> -CCGTACTGGTTACAACGA [SEC ID N.º: 136]
52MLPr2T30	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -(T) <sub>30</sub> -CCGTACTGGTTACAACGA [SEC ID N.º: 137]
52MLPr2T40	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -(T) <sub>40</sub> -CCGTACTGGTTACAACGA [SEC ID N.º: 138]

10

**Tabla 12c.** Los nucleótidos idénticos están indicados por un "-".

Diana	Alineamiento con la sonda 51SLPr2	Número de apareamientos erróneos
HPV 51	CTATTTGCTGGAACAATC [SEC ID N.º: 122]	0
HPV 33	T-----T—GG— [SEC ID N.º: 123]	4

**Tabla 12d.** Los nucleótidos idénticos están indicados por un "-".

Diana	Alineamiento con la sonda 52MLPr2	Número de apareamientos erróneos
HPV 52	CCGTACTGGTTACAACGA [SEC ID N.º: 73]	0
HPV 16	--T--T ----- [SEC ID N.º: 139]	2

**Tabla 12e**

Sonda	hibridada a la diana	Señal (IFM)	diana / sonda (%)	Señal/ruido	Observación	Ej.
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV51	4291	100	172	Específica	ID64
51SLPr2	SPF <sub>10</sub> HPV33	358	8	14	Reacción cruzada	ID64
51SLPr2T10	SPF <sub>10</sub> HPV51	4688	100	122	Específica	ID64
51SLPr2T10	SPF <sub>10</sub> HPV33	34	1	1	Negativa	ID64
51SLPr2T20	SPF <sub>10</sub> HPV51	8712	100	387	Específica	ID64
51 SLPr2T20	SPF <sub>10</sub> HPV33	32	0	1	Negativa	ID64
51 SLPr2T30	SPF <sub>10</sub> HPV51	8077	100	414	Específica	ID64
51SLPr2T30	SPF <sub>10</sub> HPV33	30	0	1	Negativa	ID64
51SLPr2T40	SPF <sub>10</sub> HPV51	7356	100	320	Específica	ID64
51SLPr2T40	SPF <sub>10</sub> HPV33	32	0	1	Negativa	ID64

5

**Tabla 12f**

Sonda	hibridada a la diana	Señal (IFM)	diana / sonda (%)	Señal/ruido	Observación	Ej.
51 MLPr2	MPF HPV52	423	100	13	Específica	ID69
51MLPr2	MPF HPV16	32	8	1	Reacción cruzada	ID69
51 MLPr2T20	MPF HPV52	1233	100	95	Específica	ID69
51MLPr2T20	MPF HPV16	11	1	1	Negativa	ID69
51 MLPr2T30	MPF HPV52	1250	100	139	Específica	ID69
51MLPr2T30	MPF HPV 16	8	1	1	Negativa	ID69
51MLPr2T40	MPF HPV52	1510	100	126	Específica	ID69
51MLPr2T40	MPF HPV16	9	1	1	Negativa	ID69

**Ejemplo 11 de tablas:**

**Tabla 13a.** 18MLPr7 = versión 7 de la sonda de MPF 18; C<sub>12</sub> = un tramo de 12 átomos de carbono; (T)<sub>40</sub> = un tramo de 40 nucleótidos de timina; (TTG)<sub>13</sub> = un tramo de 13 tripletes de nucleótidos timina-timina-guanina (39 nucleótidos en total)

10

Nombre	Composición de la sonda
18MLPr7T40	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -(T) <sub>40</sub> -TTACATAAGGCACAGG [SEC ID N.º: 125]
18MLPr7(TTG) <sub>13</sub>	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -(TTG) <sub>13</sub> -TTACATAAGGCACAGG [SEC ID N.º: 140]

**Tabla 13b.** nc8 = control negativo 8 que muestra la reacción cruzada con todas las sondas en el ensayo LiPa; ADN- = control negativo

Sonda	hibridada a la diana	Señal (IFM)	diana / sonda (%)	Señal/ruido	Observación	Ej.
18MLPr7T40	MPF HPV18	2001	100	13	Específica	ID 169
18MLPr7T40	nc8	1104	54	7	Reacción cruzada	ID 169
18MLPr7T40	ADN-	2	0	0	Negativa	ID 169
18MLPr7 (TTG) <sub>13</sub>	MPF HPV18	2390	100	199	Específica	ID 169
18MLPr7 (TTG) <sub>13</sub>	nc8	23	1	2	Negativa	ID 169
18MLPr7 (TTG) <sub>13</sub>	ADN-	2	0	0	Negativa	ID 169

5 **Ejemplo 12 de tablas:**

**Tabla 14a.** 18MLPr7 = versión 7 de la sonda de MPF 18; C<sub>12</sub> = un tramo de 12 átomos de carbono; (T)<sub>40</sub> = un tramo de 40 nucleótidos de timina; N5 = conector de aminoácidos del extremo 5'; N3 = conector de aminoácidos del extremo 3'.

Nombre	Composición de la sonda
18MLPr7T40N5	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -(T) <sub>40</sub> -TTACATAAGGCACAGG [SEC ID N.º: 125]
18MLPr7T40N3	TTACATAAGGCACAGG-(T) <sub>40</sub> -C <sub>12</sub> -NH <sub>2</sub> [SEC ID N.º: 141]
45MLPr8T40N5	NH <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -(T) <sub>40</sub> -CCAGGGCCATAACAAG [SEC ID N.º: 142]
45MLPr8T40N3	CCAGGGCCATAACAAG-(T) <sub>40</sub> -C <sub>12</sub> -NH <sub>2</sub> [SEC ID N.º: 143]



(continuación)

Sonda	hibridada a la diana	Señal (IFM)	diana / sonda (%)	Señal/ruido	Observación	Ej.
45MLPr8T40N5	MPF HPV13	611	38	51	Reacción cruzada	ID141
45MLPr8T40N5	MPF HPV39	284	18	24	Reacción cruzada	ID141
45MLPr8T40N5	MPF HPV40	1021	64	85	Reacción cruzada	ID141
45MLPr8T40N5	MPF HPV45	1600	100	133	Específica	ID141
45MLPr8T40N3	MPF HPV 13	47	8	8	Reacción cruzada	ID141
45MLPr8T40N3	MPF HPV39	17	3	3	Negativa	ID141
45MLPr8T40N3	MPF HPV40	116	19	19	Reacción cruzada	ID141
45MLPr8T40N3	MPF HPV45	615	100	103	Específica	ID141

**Tablas 15a y b:**

IFM			Diana/sonda (%)		
Diana	Perla/sonda A1	Perla/sonda A2	Diana	Perla/diana A1	Perla/diana A2
<b>a</b>	988	4399	<b>a</b>	100	100
<b>b</b>	13	14	<b>b</b>	1	0
<b>c</b>	19	19,5	<b>c</b>	2	0
<b>d</b>	5	13	<b>d</b>	1	0
<b>e</b>	3	4	<b>e</b>	0	0
<b>f</b>	11	6	<b>f</b>	1	0
<b>g</b>	14	9	<b>g</b>	1	0
<b>h</b>	3	3	<b>h</b>	0	0

**% diana/sonda:**  
 AI, a =  $988/988 * 100 = 100\%$ ;  
 AI, c =  $19/988 * 100 = 2\%$

**Tablas 16a y b:**

IFM			señal/ruido		
Diana	Perla/sonda A1	Perla/sonda A2	Diana	Perla/diana A1	Perla/diana A2
<b>A</b>	988	4399	<b>a</b>	82	400
<b>B</b>	13	14	<b>b</b>	1	1
<b>C</b>	19	19,5	<b>c</b>	2	2
<b>D</b>	5	13	<b>d</b>	0	1
<b>E</b>	3	4	<b>e</b>	0	0
<b>F</b>	11	6	<b>f</b>	1	1
<b>G</b>	14	9	<b>g</b>	1	1
<b>H</b>	3	3	<b>h</b>	0	0
<b>Media</b>	12	11			

**Señal/ruido:**  
 AI, a = 988/12 (= media (988, 13, 19,5, 3, 11, 14, 3)) = 82;  
 AI, c = 19/12 (media (988, 13, 19, 5, 3, 11, 14, 3)) = 2.

**Ejemplo 13**

5 **Sondas de HPV adecuadas para su uso con enfoques basados en perlas, p.ej., para los enfoques basados en Luminex:**

**Tabla 17**

Nombre	Secuencia de la sonda	SEC ID N.º
16MLP4T40N3	GAGCACAGGGCCAC(T) <sub>40</sub>	154
18MLPr7T40N3	TTACATAAGGCACAGG(T) <sub>40</sub>	146
26MLP7T40N3	GTTACAACGTGCACAG(T) <sub>40</sub>	155
31MLPr6T40N3	GGATGCAACGTGCTC(T) <sub>40</sub>	156
33MLPr4T40N5	(T) <sub>40</sub> CATATTGGCTACAACGT	157
35MLPr6T40N3	GTGCACAAGGCCATA(T) <sub>40</sub>	158
39MLPr4T40N5	(T) <sub>40</sub> GCCTTATTGGCTACATAA	280
45MLPr6T40N5	(T) <sub>40</sub> GGTGTACATAAGGCCAG	160
45MLPr8T40N3	CCAGGGCCATAACAAG(T) <sub>40</sub>	143
51MLPr2T40N5	(T) <sub>40</sub> TTATTGGCTCCACCGT	126
52MLPr2T40N5	(T) <sub>40</sub> CCGTTACTGGTTACAACGa	138
53MLPr6T40N5	(T) <sub>40</sub> ATATTGGCTGCAACGT	161
56MLPr4T40N5	(T) <sub>40</sub> GGCCCAAGGCCATAATAA	162
58MLPr1T40N5	(T) <sub>40</sub> CTTATTGGCTACAGCGT	163
58MLPr5T40N3	ACAGCGTGCACAAGG(T) <sub>40</sub>	164

(continuación)

Nombre	Secuencia de la sonda	SEC ID N.º
59MLPr3T40N5	(T) <sub>40</sub> CAAGGCTCAGGGTTTAA	165
66MLPr6T40N3	TGCACAGGGCCATA(T) <sub>40</sub>	166
66MLPr7T40N3	TGCAACGTGCACAG (T) <sub>40</sub>	167
68MLPr8T40N5	(T) <sub>40</sub> CTGCACAAGGCACAG	168
68MLPr10T40N3	GCACAAGGCACAGG(T) <sub>40</sub>	169
70MLPr4T40N5	(T) <sub>40</sub> CCTATTGGTTGCATAAAGG	170
82MLPr3T40N3	ATTGGTTGCATCGCG(T) <sub>40</sub>	171

5 En un aspecto de la invención, se puede usar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ó 22 sondas cualquiera o todas las sondas anteriores en una reacción múltiplex basada en perlas en condiciones idénticas para la detección simultánea de cualquier ADN diana del HPV presente en la muestra. Dichos conjuntos de perlas son adecuados para su uso en el esquema de reacción optimizado explicado resumidamente con anterioridad. Se puede incorporar un espaciador de policarbono adicional.

**Ejemplo 14: Detección universal de amplímeros de MPF del HPV en un análisis de placas de microtitulación de 96 pocillos, inmunoensayo enzimático de ADN (DEIA)**

10 **Introducción**

El presente ejemplo describe el uso de una mezcla de 8 sondas para la detección universal de los amplímeros de HPV obtenidos tras una PCR de amplio espectro con cebadores de MPF.

15 (En el presente trabajo, se hace referencia al análisis de las regiones de la Figura 1 como el análisis de MPF, y a los cebadores y sondas usados en la presente memoria, como cebadores y sondas de MPF. La región amplificada es el amplímero de MPF. De este modo, los cebadores y las sondas se diferencian del conjunto de cebadores y sondas de "SPF10" también desarrollado en este laboratorio que se usa en el análisis de una región diferente del gen L1).

**Materiales y procedimientos**

Para la detección universal de los amplímeros de MPF del HPV, se seleccionaron sondas del alineamiento de secuencias de HPV de la Figura 1. Las secuencias de las sondas de DEIA universales se enumeran en la Tabla 3.

20 Los amplímeros de MPF se obtuvieron mediante la amplificación de plásmidos de HPV que contenían los genotipos del HPV 6, 11, 13, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 70, 71 y 74 (amablemente proporcionados por Dr. E-M. de Villiers, Dr. R. Ostrow, Dr. A. Lorincz, Dr. T. Matsukura y Dr. G. Orth) o secuencias de oligonucleótido que representan los genotipos del HPV 7, 40, 42, 61, 72, 73, 81-87, 90, 91, y 2 secuencias de variantes del HPV de genotipo 16.

25 La amplificación del ADN del HPV se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía 10 µl de ADN diana, 1 x tampón PCR II (Perkin Elmer), MgCl<sub>2</sub> 3,0mM, desoxinucleósido-trifosfato 0,2mM, 10 pmol de cada cebador directo e inverso (Tabla 1 y 2) y 1,5 U de AmpliTaqGold (Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey, EE.UU.). Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: precalentamiento durante 9 min a 94°C, seguidos de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C; 45 segundos a 52°C y 45 segundos a 72°C y una extensión final a 72°C.

30 Los amplímeros, sintetizados mediante cebadores de PCR de MPF biotinilados, se detectaron mediante la hibridación con una mezcla de 8 sondas específicas del HPV (véanse las sondas preferidas de la Tabla 3). Se diluyeron diez microlitros de producto de PCR en 100 µl de tampón de hibridación (150 mmol/l de NaCl; 15 mmol/l de citrato de sodio, pH 7,0, Tween 20 al 0,1%) y se incubaron a 42°C durante 30 minutos en placas de microtitulación revestidas de estreptavidina. Se retiraron los materiales no capturados mediante tres lavados con tampón de hibridación. Se desnaturalizaron los productos de PCR capturados bicatenarios mediante la adición de 100 µl de solución desnaturalizante (100 mmol/l de NaOH) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, tras lo que se realizaron tres lavados con tampón de hibridación. Se diluyó una mezcla de sondas específicas del HPV marcadas con digoxigenina (DIG) (véanse las sondas preferidas de la Tabla 3) en tampón de hibridación, y se añadieron al pocillo y se incubaron a 42°C durante 45 minutos. Se lavaron los pocillos tres veces y se añadió conjugado de fosfatasa alcalina contra la DIG y se incubaron a 42°C durante 15 minutos. Tras cinco lavados, se añadió sustrato y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se detuvo la reacción mediante la adición de 100 µl de 0,5 mmol/l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se determinaron las densidades ópticas (DO) a 450 nm en un lector de placas de microtitulación. Las muestras se consideraron positivas cuando la DO<sub>450</sub> fue 2,5 veces superior al control de PCR negativo (valor de corte). En cada

serie, se analizaron los controles negativos, así como los controles positivos y los controles positivos límite junto con las muestras.

### Resultados

5 Todos los amplímeros de los genotipos del HPV 6, 7, 11, 13, 16, 18, 26, 30-35, 39, 40, 42-45, 51-59, 66-74, 81-87, 90, 91 y las secuencias de 2 variantes del HPV de genotipo 16 reaccionaron con la mezcla de las 8 sondas seleccionadas.

### Conclusiones

10 Se desarrolló una mezcla de 8 sondas para la detección universal de los amplímeros de MPF del HPV. Las 8 sondas seleccionadas detectaron satisfactoriamente los diversos genotipos del HPV, aunque los amplímeros de los genotipos del HPV 51, 57, 71, 84, 87, 13, 91, 11, 59, 30, 44, 55, 70, 52, 69, 84, 86, 74 y las 2 variantes del genotipo 16 muestran un apareamiento erróneo de un nucleótido con la mejor sonda coincidente.

### Ejemplo 15: Desarrollo de un análisis de genotipificación de MPF del HPV

#### Introducción

15 El presente ejemplo describe un análisis de genotipificación de MPF del HPV para la detección y la identificación simultáneas de genotipos del HPV. Tras la amplificación de amplio espectro del HPV usando cebadores de MPF, es posible detectar e identificar los amplímeros sintetizados mediante la hibridación con sondas específicas de cada genotipo que se aplican sobre una tira de hibridación inversa.

#### Materiales y procedimientos

##### Selección de sondas:

20 En base a las secuencias de 31 pb ubicadas entre las secuencias diana del cebador directo e inverso de la Tabla 1 y 2, se seleccionaron sondas específicas de cada tipo. Estas secuencias de sonda se enumeran en la Tabla 4 y en la siguiente Tabla 18.

##### Plásmidos de HPV y oligos de HPV

25 Se analizaron la sensibilidad y la especificidad analíticas de las sondas seleccionadas. Se obtuvieron amplímeros de MPF del HPV mediante PCR usando 10 cebadores de MPF directos y 8 cebadores de MPF inversos que contenían un resto de biotina en el extremo 5'. Véanse las Tablas 1 y 2. La PCR del HPV se realizó según lo descrito en el Ejemplo 1.

##### Desarrollo de un análisis de genotipificación mediante hibridación inversa de MPF de HPV

30 Para la detección y la identificación simultáneas de diferentes genotipos del HPV, se desarrolló un análisis de genotipificación mediante hibridación inversa. El análisis de múltiples sondas en una sola etapa de hibridación requiere la selección de sondas específicas de tipo que tengan características de hibridación similares.

35 En el presente experimento, se seleccionaron sondas para los tipos del HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 82 y 2 sondas de confirmación para el tipo 53 y 66. El nombre de la sonda comienza con el número del tipo de HPV, excepto las sondas seleccionadas para la confirmación. Estas sondas comienzan con una "c" seguida del número de tipo de HPV. La sonda c53L1nPr3 se selecciona para la exclusión del tipo 61 y c66L1nPr5 se selecciona para la exclusión del tipo 89.

Se seleccionaron y se ordenaron sondas de oligonucleótido con una cola poli-T en el extremo 5' o 3', respectivamente. Esas sondas se inmovilizaron en líneas paralelas sobre una tira de nitrocelulosa. Para controlar la reacción entre conjugado y sustrato, también se aplicó ADN biotinilado sobre la tira.

En la Figura 7, se muestra un posible esquema de una tira que se podría usar.

40 Se desnaturalizaron diez microlitros de producto de la PCR que contenía restos de biotina en los extremos 5' de los cebadores mediante la adición de 10µl de solución de NaOH. Tras 10 min, se colocó sobre la bandeja una tira de hibridación inversa. Se añadieron dos mililitros de tampón de hibridación precalentado (37°C) (3x SSC [1 x SSC es Na-citrato 15mM y NaCl 150mM], dodecilsulfato de sodio al 0,1%) y se incubaron a 54 ± 0,5°C durante 1 h. Todas las incubaciones y etapas de lavado se realizaron automáticamente en un Auto-LiPA. Se lavaron dos veces las tiras durante 30 s y una vez durante 30 min a 54°C con 2 ml de solución de hibridación. Tras este lavado riguroso, se incubaron las tiras con 2 ml de conjugado de fosfatasa alcalina-estreptavidina durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron las tiras dos veces con 2 ml de solución de aclarado (tampón de fosfato que contenía NaCl, Triton y NaN<sub>3</sub> al 0,5%) y una vez con 2 ml de tampón de sustrato. Se añadieron dos mililitros de sustrato (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y nitroazul de tetrazolio) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción mediante la aspiración de la solución de sustrato y la adición de 2 ml de agua destilada. Tras secar, se interpretaron a ojo los resultados de las tiras.

50

**Resultados:**

Los amplímeros obtenidos de los tipos de HPV 16, 18, 26, 31, 33 y 35 se usaron en un experimento de hibridación inversa para determinar la especificidad de las sondas seleccionadas de la Tabla 18.

**Tabla 18**

Nombre	Secuencia de la sonda	Inicio	Longitud	100 x T de cola T	SEC ID N.º
16L1nPr5.CH	AG CACAGGGCCACA	39	14	3'	172
18L1nPr7.CH	TTACATAAGGCACAGG	31	16	3'	293
26L1nPr7.CH	GTTACAACGTGCACAG	30	16	3'	173
31L1nPr4.CH	ACCATATTGGATGCAAC	21	17	5'	174
33L1nPr3.CH	CCATATTGGCTACAACG	22	17	5'	304
35L1nPr6.CH	GTGCACAAGGCCATA	38	15	3'	175
39L1nPr6.CH	GCCTTATTGGCTACATAAG	21	19	5'	176
45L1nPr10.CH	TTACATAAGGCCCAGG	31	16	3'	177
51L1nPr4.CH	ggATTGGCTCCACCGTG	24	15	5'	178
52L1nPr4.CH	ACCGTACTGGTTACAAC	21	17	5'	179
53L1CPr6.CH	ATATTGGCTGCAACGT	24	16	5'	180
c53L1nPr3.CH	ACGTGCCCAGGGAC	36	14	5'	181
56L1nPr6.CH	TGCCCAAGGCCATAAT	39	16	5'	335
58L1nPr1.CH	CTTATTGGCTACAGCGT	23	17	5'	336
59L1nPr3.CH	CAAGGCTCAGGGTTTAA	36	17	5'	182
(66L1nPr6.CH	TGCACAGGGCCATA	39	14	3'	183
c66L1nPr5.CH	GCAACGTGCACAGG	33	14	3'	184
68L1nPr10.CH	GCACAAGGCACAGG	33	14	3'	185
70L1nPr4.CH	CCTATTGGTTGCATAAGG	23	18	5'	358
82L1nPr3.CH	ATTGGTTGCATCGCG	26	15	3'	186
La minúscula indica secuencia no específica del tipo					

5

Los resultados se muestran en la Figura 8.

**Conclusión**

El ensayo de hibridación inversa permite al menos la identificación positiva de los tipos de HPV 16, 18, 26, 31, 33 y 35. Por tanto, también se pueden usar las correspondientes sondas simultáneamente en una reacción múltiplex. El ensayo se puede ampliar añadiendo sondas para el resto de los tipos de HPV genitales.

10

**Ejemplo 16: Inmunoensayo enzimático de ADN del HPV de MPF de alto riesgo (DEIA de MPF del HPV de AR) para la detección de 13 genotipos del HPV de alto riesgo****Introducción**

El presente ejemplo describe el uso de una mezcla de 13 sondas de oligonucleótido específicas de tipo del HPV marcadas con digoxigenina en un inmunoensayo enzimático de ADN (DEIA) para la detección específica y simultánea en placas de microtitulación de amplímeros de 13 genotipos de alto riesgo (seleccionados) del HPV (tipos 16, 18, 31,

15

33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) obtenidos tras una PCR de amplio espectro, mientras que los amplímeros de otros genotipos del HPV permanecen sin detectar.

**Materiales y procedimientos**

- 5 Tras la amplificación del HPV universal, se pueden detectar amplímeros biotinilados sintetizados en un DEIA mediante la hibridación con una mezcla de 13 sondas de oligonucleótido marcadas con digoxigenina específicas de HPV de alto riesgo (Tabla 19 de mejores opciones). Las secuencias de estas sondas se seleccionaron del alineamiento de secuencias de HPV de la Figura 1 y se enumeran en la Tabla 19. Algunas sondas de oligonucleótido contienen ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

Tabla 19: Sondas de MPF de alto riesgo para DEIA

Sonda de oligonucleótido	Secuencia 5'>3'	Modificación	Posición inicial	SEC ID N.º:
16pr4 dig	tggttacaacgagcac	5'-DIG	29	187
16prM1 dig	gttacaacgagcac	5'-DIG	31	188
16prM2 dig	ttacaacgagcac	5'-DIG	32	189
16prM3 dig*	gagcacagggccaca	5'-DIG	39	190
18prM1 dig*	gttacataaggcacagggtc	5'-DIG	31	191
31prM1 dig	aaccatattggatgcaacgt	5'-DIG	21	192
31prM2 dig	aaccatattggatgcaacg	5'-DIG	21	193
31prM3 dig	aaccatattggatgcaac	5'-DIG	21	194
31prM3LAAG dig*	aAccatattggATGcaac	5'-DIG + LNA	21	195
31prM4 dig	aaaccatattggatgcaac	5'-DIG	20	196
33pr5 dig	aacgtgcacaaggtcat	5'-DIG	36	197
33prM1 dig	cgtgcacaaggtc	5'-DIG	38	198
33prM2 dig	gtgcacaaggtcat	5'-DIG	39	199
33prM3 dig	aacgtgcacaaggt	5'-DIG	36	200
33prM4mm6T dig*	gctactacgtgcacaaggtc	5'-DIG	31	201
33prM4mm13T dig	gctacaacgtgctcaaggtc	5'-DIG	31	202
35prM1 dig*	cgtgcacaagggccata	5'-DIG	38	203
39prM1 dig	ttattggctacataaggccc	5'-DIG	25	204
39prM1LA dig*	ttattggctacaTaaggccc	5'-DIG + LNA	25	205
39prM2 dig	ttattggctacataaggccca	5'-DIG	25	206
45pr6a dig	gttacataaggcccgag	5'-DIG	31	207
45pr7 dig	ccagggccataaaca	5'-DIG	43	208
45prM1 dig	ttacataaggccca	5'-DIG	32	209
45prM2 dig	gttacataaggcc	5'-DIG	31	210
45prM3 dig	ggttacataaggcc	5'-DIG	30	211
45prM4 dig	catattggttacataaggccc	5'-DIG	24	212
45prM5 dig	gtcatattggttacataaggccc	5'-DIG	22	213
45prM6 dig	catattggttacataaggcc	5'-DIG	24	214
45prM6LTdig	catattggttacaTaaggcc	5'-DIG + LNA	24	215
45prM6LA dig	cAtattggttacataaggcc	5'-DIG + LNA	24	216
45prM6LAT dig*	cAtattggttacaTaaggcc	5'-DIG + LNA	24	217
51prM1 dig*	gctccaccgtgcgc	5'-DIG	31	218
52pr3 dig	ccgtactggttacaac	5'-DIG	23	219
52pr4 dig	accgtactggttacaac	5'-DIG	22	361
52prM1 dig	accgtactggttac	5'-DIG	22	220
52prM2 dig	accgtactggtta	5'-DIG	22	221
52prM3 dig*	aaccgtactggttacaacg	5'-DIG	21	222
56pr4a dig	gccaaggccataataa	5'-DIG	41	223
56prM1 dig*	cgtgcccaaggccata	5'-DIG	38	224
58prM1 dig*	gctacagcgtgcacaag	5'-DIG	31	225
59prM1 dig*	cacaaggctcagggttaa	5'-DIG	35	226
68prM1 dig*	gctgcacaaggccacag	5'-DIG	31	227

Mayúscula indica modificación de ácido nucleico bloqueado (LNA)

DIG es digoxigenina

Sonda de oligonucleótido que supone la mejor elección

Para la evaluación de la especificidad del DEIA, se obtuvieron amplímeros de MPF mediante la amplificación de plásmidos de HPV que contenían los genotipos del HPV 6, 11, 16, 18, 26, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 43, 44, 45, 51, 52, 53,

54, 55, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 70, 71 y 74 (amablemente proporcionados por Dr. E-M. de Villiers, Dr. R. Ostrow, Dr. A. Lorincz, Dr. T. Matsukura y Dr. G. Orth) o secuencias de oligonucleótido que representan los genotipos del HPV 7, 40, 42, 61, 72, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 91 y 2 secuencias de variantes del genotipo 16 del HPV.

5 La amplificación del ADN del HPV se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía 10 µl de ADN diana, 1 x tampón PCR II (Perkin Elmer), MgCl<sub>2</sub> 3,0mM, desoxinucleósido-trifosfato 0,2mM, 10 pmol de cada cebador directo e inverso (Tabla 1 y 2) y 1,5 U de AmpliTaqGold (Perkin Elmer, Branchburg, New Jersey, EE.UU.). Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: precalentamiento durante 9 min a 94°C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C; 45 segundos a 52°C y 45 segundos a 72°C y una extensión final a 72°C.

10 Se diluyeron diez microlitros de producto de PCR, sintetizado mediante cebadores de MPF para PCR biotinilados, en 100 µl de tampón de hibridación (150 mmol/l de NaCl; 15 mmol/l de citrato de sodio, pH 7,0, Tween 20 al 0,1%) y se incubaron a 45°C durante 30 minutos en placas de microtitulación revestidas de estreptavidina. Se retiraron los materiales no capturados mediante tres lavados con tampón de hibridación. Se desnaturalizaron los productos de PCR capturados bicatenarios mediante la adición de 100 µl de solución desnaturalizante (100 mmol/l de NaOH) y se incubaron durante 5-15 minutos a temperatura ambiente, tras lo que se realizaron tres lavados con tampón de hibridación. Se diluyó una mezcla de sondas específicas de HPV marcadas con digoxigenina (DIG) (véanse las sondas preferidas de la Tabla 3) en tampón de hibridación, y se añadieron al pocillo y se incubaron a 45°C durante 45 minutos. Se lavaron los pocillos tres veces con solución de lavado rigurosa (37,5 mmol/l de NaCl; 3,75 mmol/l de citrato de sodio, pH 7,0, Tween 20 al 0,025%), y se añadieron 300 µl de solución de lavado rigurosa a los pocillos y se incubaron a 45°C durante 45 minutos. Se lavaron los pocillos dos veces con solución de lavado rigurosa y dos veces con tampón de hibridación. Posteriormente, se añadió conjugado de fosfatasa alcalina contra DIG y se incubó a 45°C durante 15 minutos. Tras cinco lavados, se añadió sustrato y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se detuvo la reacción mediante la adición de 100 µl de 0,5 mmol/l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se determinaron las densidades ópticas (DO) a 450 nm en un lector de placas de microtitulación. Las muestras se consideraron positivas cuando la DO<sub>450</sub> fue 2,5 veces superior al control negativo. En cada serie, se analizaron los controles negativos, así como los controles positivos y los controles positivos límite junto con las muestras clínicas.

### Resultados

Se reactivaron todos los amplímeros de los genotipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 y 2 secuencias variantes del genotipo de HPV 16 con la mezcla de 13 sondas seleccionadas, mientras que los amplímeros de los genotipos del HPV 6, 7, 11, 26, 30, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 61, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 82, 83, 84, 85, 87 y 91 permanecieron sin ser detectados.

### Conclusiones

El DEIA de MPF del HPV de AR descrito detecta simultáneamente los genotipos de HPV de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68, mientras que otros genotipos de HPV quedan sin detectar. Los 13 genotipos de alto riesgo seleccionados se pueden detectar tras la PCR universal usando el nuevo conjunto de cebador desarrollado según lo descrito en la presente patente. El ensayo de detección se puede ampliar aún más con sondas para otros posibles genotipos de HPV de alto riesgo.

### Ejemplo 17: Sensibilidad del DEIA de MPF del HPV universal y el DEIA de MPF del HPV de AR

#### Introducción

El presente ejemplo describe la determinación de la sensibilidad analítica del DEIA de MPF del HPV universal y el DEIA de MPF del HPV de AR y la comparación con el sistema de detección y tipificación SPF10.

#### Materiales y procedimientos

Para la evaluación de la sensibilidad analítica del DEIA de MPF del HPV universal y el DEIA de MPF del HPV de AR, se obtuvieron amplímeros de MPF mediante la amplificación de diluciones x 10 de plásmidos de HPV que contenían los genotipos del HPV 18, 31, 33, 35 y 45 (amablemente proporcionados por Dr. E-M. de Villiers, Dr. R. Ostrow, Dr. A. Lorincz, Dr. T. Matsukura y Dr. G. Orth).

La PCR de SPF10 y el análisis de amplímeros se realizó según Kleter *et al* 1998 y 1999 [Kleter, B., L. J. van Doorn, L. Schrauwen, A. Moliijn, S. Sastrowijoto, J. ter Schegget, J. Lindeman, B. ter Harmsel, and W. G. V. Quint., 1999. "Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus". *J. Clin. Microbiol.* 37:2508-2517; Kleter, B., L. J. van Doorn, J. ter Schegget, L. Schrauwen, C. van Krimpen, M. P. Burger, B. ter Harmsel y W. G. V. Quint. 1998. "A novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses". *Am. J. Pathol.* 153: 1731-1739].

Resultados- Véase más adelante

Con el uso de un límite de 2,5 veces la DO<sub>450</sub> del control negativo, la sensibilidad analítica calculada del DEIA de MPF

ES 2 380 115 T3

del HPV universal y el DEIA de MPF del HPV de AR varió de 12 a 72 ag (correspondiente a un equivalente de aproximadamente 2 a 15 copias del genoma viral) y de 48 a 722 ag (correspondiente a un equivalente de aproximadamente 10 a 150 copias del genoma viral), respectivamente. Todavía no se ha realizado el límite formal de la prueba de detección.

5

Resultados - Tabla 20a - e

~una copia					
HPV18		4,8 fg/PCR	480 ag/PCR	48 ag/PCR	4,8 ag/PCR
DEIA de SPF10	de	+	+	+	+
LiPA de SFP10	de	+	+	+	+
DEIA de MPF		+	+	+	-
DEIA de MPF de AR		+	+	+	-
20a					
HPV31		5,6 fg/PCR	560 ag/PCR	56 ag/PCR	5,6 ag/PCR
DEIA de SPF10	de	+	+	+	-
LiPA de SFP10	de	+	+	+	-
DEIA de MPF		+	+	+	-
DEIA de MPF de AR		+	+	+	-
20b					
HPV33		4,9 fg/PCR	490 ag/PCR	49 ag/PCR	4,9 ag/PCR
DEIA de SPF10	de	+	+	-	-
LiPA de SFP10	de	+	+	+/-	-
DEIA de MPF		+	+	+	-
DEIA de MPF de AR		+	+	+	-
20c					
HPV35		7,22 fg/PCR	722 ag/PCR	72,2 ag/PCR	7,22 ag/PCR
DEIA de SPF10	de	+	+	+	-
LiPA de SFP10	de	+	+	+	-
DEIA de MPF		+	+	+	-
DEIA de MPF de AR		+	+	-	-
20d					

(Continuación)

HPV45	12 fg/PCR	1,2 fg/PCR	120 ag/PCR	12 ag/PCR
DEIA de SPF10	+	+	+	-
LiPA de SFP10	+	+	+	-
DEIA de MPF	+	+	+	+
DEIA de MPF de AR	+	+	+	-
20e				

**Conclusiones**

- 5 En resumen, el DEIA de MPF del HPV universal y el DEIA de MPF del HPV de AR tienen sensibilidades similares al DEIA de SPF10 y al LiPA.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la detección y/o la tipificación del Virus del Papiloma Humano (HPV) presente en una muestra biológica, procedimiento que comprende las etapas de:
- 5 (i) amplificación de un fragmento de ácido polinucleico que comprende los nucleótidos 6566-6596 de la secuencia de referencia del HPV 16 K02718 (o K02718.1) que tiene la secuencia 5' TTATTGGTTACAACGAGCACAGGGCCACAAT3' o región equivalente de otros tipos de HPV (Región B) de la muestra mediante el uso de:
- 10 - un cebador 5' que se hibrida específicamente con la región "A" del genoma del HPV 16 o región equivalente de otro genoma del HPV, estando dicha región "A" indicada en la Figura 1 y siendo la región A de la secuencia de referencia 5' GATGCCCAAATATTCAATAAACC 3';
- un cebador 3' que se hibrida específicamente con la región "C" del genoma de al menos un tipo de HPV, estando dicha región "C" indicada en la Figura 1 y siendo la región C de la secuencia de referencia 5' AATGGCATTGTGGGGTAACCA 3'.
- 15 (ii) hibridación de los fragmentos amplificados de la etapa (i) con al menos una sonda capaz de hibridarse específicamente con los nucleótidos 6566-6596 de la secuencia de referencia del HPV 16 K02718 (o K02718.1) o región equivalente de otros tipos de HPV.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la sonda es capaz de hibridarse específicamente con la región B del genoma de un solo tipo de HPV.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1 ó 2 que hibrida los fragmentos amplificados de fragmentos de ácido polinucleico de la etapa (i) con una pluralidad de sondas que comprenden los nucleótidos 6566-6596 con referencia a la secuencia de HPV 16 con número de acceso del banco de genes K02718.1 o las posiciones equivalentes a los mismos de otras secuencias del HPV, en el que cada sonda es capaz de hibridarse específicamente con un genoma de un solo tipo de HPV.
- 20 4. Un procedimiento según la reivindicación 1, 2 ó 3 en el que la sonda se selecciona de la enumeración que consiste en las secuencias enumeradas en las Tablas 4, 5-14, 17, 18, 19.
5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la etapa de amplificación usa un cebador seleccionado de la enumeración que comprende: HPV-MPF1F1 (SEC ID N.º 1), HPV-MPF1F2 (SEC ID N.º 2), HPV-MPF1F3 (SEC ID N.º 3), HPV-MPF1F4 (SEC ID N.º 4), HPV-MPF1F5 (SEC ID N.º 5), HPV-MPF1F6 (SEC ID N.º 6), HPV-MPF1F7 (SEC ID N.º 7), HPV-MPF1F8 (SEC ID N.º 8), HPV-MPF1F9 (SEC ID N.º 9), HPV-MPF1F10 (SEC ID N.º 10), HPV-MPF2R1 (SEC ID N.º 11), HPV-MPF2R2 (SEC ID N.º 12), HPV-MPF2R3 (SEC ID N.º 13), HPV-MPF2R4 (SEC ID N.º 14), HPV-MPF2R5 (SEC ID N.º 15), HPV-MPF2R6 (SEC ID N.º 16), HPV-MPF2R7 (SEC ID N.º 17), HPV-MPF2R8 (SEC ID N.º 18).
- 30 6. Un procedimiento según cualquier reivindicación anterior en el que se confirma la presencia de ácido nucleico del HPV en la muestra antes de la etapa de tipificación.
7. Un procedimiento según cualquier reivindicación anterior en el que la hibridación entre la sonda y la diana se lleva a cabo en presencia de un soporte sólido.
8. Un procedimiento según la reivindicación 7, en el que la etapa de hibridación usa un formato de hibridación inversa.
9. Un procedimiento según la reivindicación 7, en el que la sonda se une directa o indirectamente sobre una perla, opcionalmente, una perla fluorescente.
- 40 10. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que se analiza la detección de la hibridación usando citometría de flujo.
11. Un kit que comprende un conjunto de cebadores directos e inversos y una tercera sonda de tipificación de oligonucleótido capaz de hibridarse con la región 6566-6596 de la secuencia de referencia del HPV 16 K02718 según lo definido la reivindicación 1 o región equivalente de otros tipos de HPV (región B), en el que los cebadores se seleccionan de la enumeración que consiste en HPV-MPF1F1 (SEC ID N.º 1), HPV-MPF1F2 (SEC ID N.º 2), HPV-MPF1F3 (SEC ID N.º 3), HPV-MPF1F4 (SEC ID N.º 4), HPV-MPF1F5 (SEC ID N.º 5), HPV-MPF1F6 (SEC ID N.º 6), HPV-MPF1F7 (SEC ID N.º 7), HPV-MPF1F8 (SEC ID N.º 8), HPV-MPF1F9 (SEC ID N.º 9), HPV-MPF1F10 (SEC ID N.º 10), HPV-MPF2R1 (SEC ID N.º 11), HPV-MPF2R2 (SEC ID N.º 12), HPV-MPF2R3 (SEC ID N.º 13), HPV-MPF2R4 (SEC ID N.º 14), HPV-MPF2R5 (SEC ID N.º 15), HPV-MPF2R6 (SEC ID N.º 16), HPV-MPF2R7 (SEC ID N.º 17), HPV-MPF2R8 (SEC ID N.º 18).
- 45 12. Un kit que comprende al menos 2 sondas capaces de hibridarse específicamente con la región B del genoma del HPV.
- 50 13. Un kit según la reivindicación 12, en el que las sondas son dos sondas cualquiera seleccionadas de cualquiera de

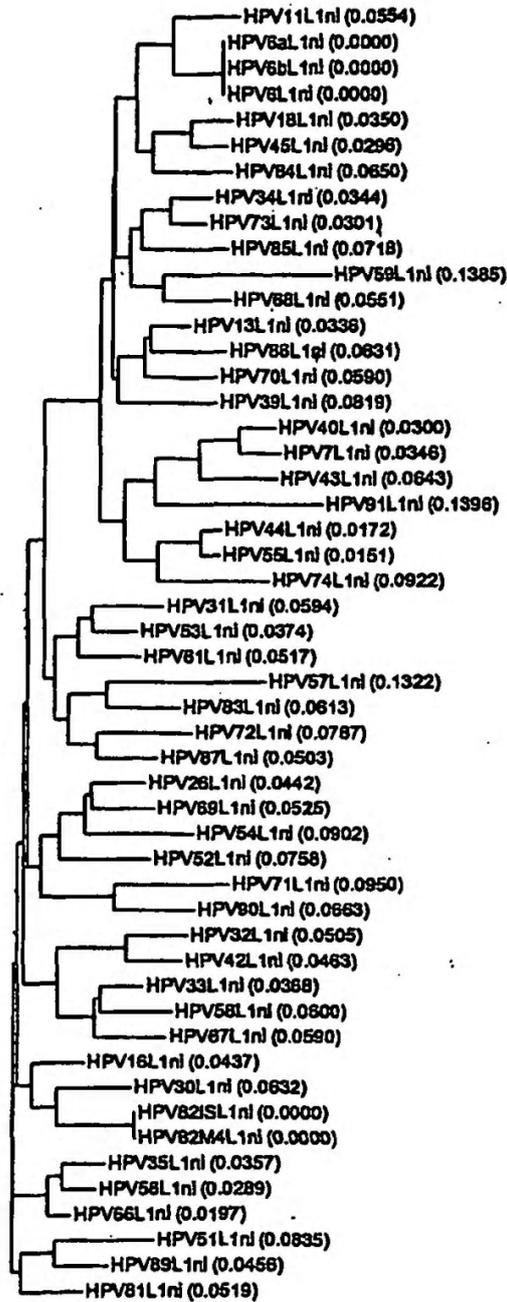
las Tablas 4, 5-14, 17, 18, 19.

14. Un kit según la reivindicación 13 que comprende un par de cebadores directo e inverso de la Tabla 1 ó 2.

15. Un kit según lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 que comprende además una sonda de la Tabla 3.



Figura 2. Árbol filogenético de la región entre cebadores



**Figura 3**

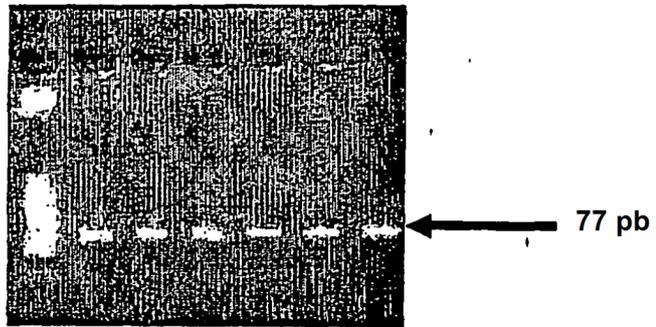


Figura 4

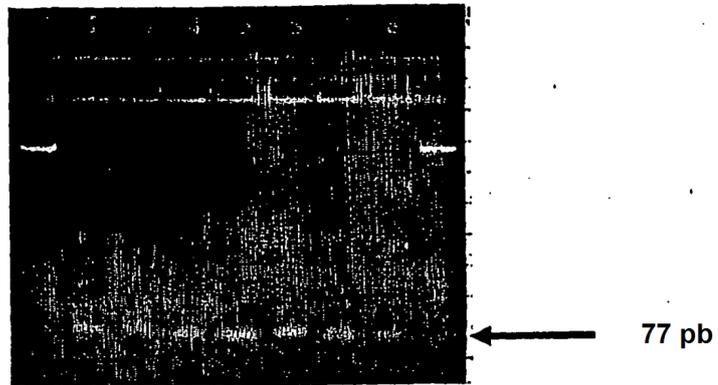
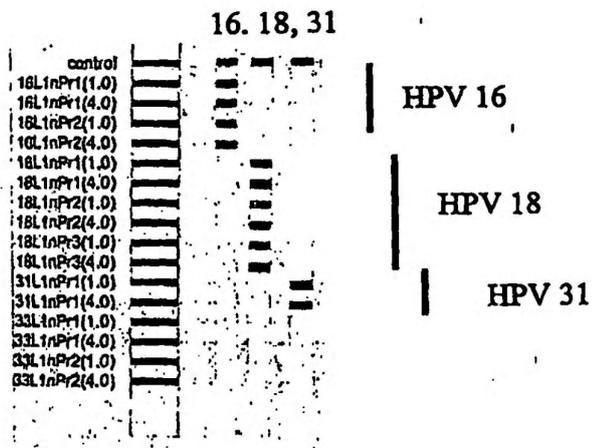


Figura 5



**Figura 6**

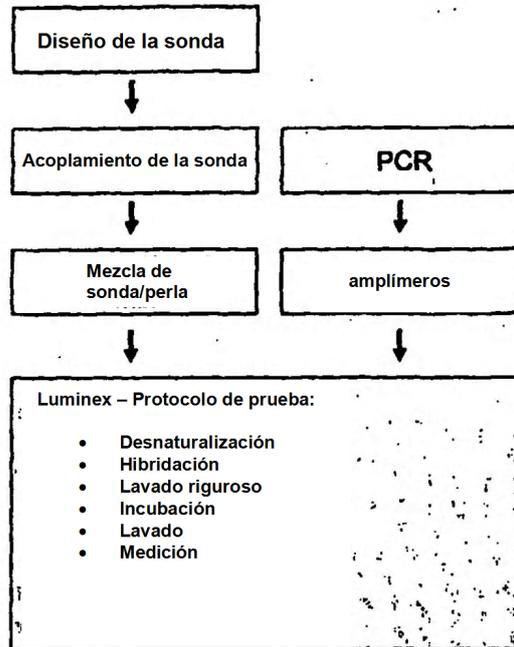


Figura 7

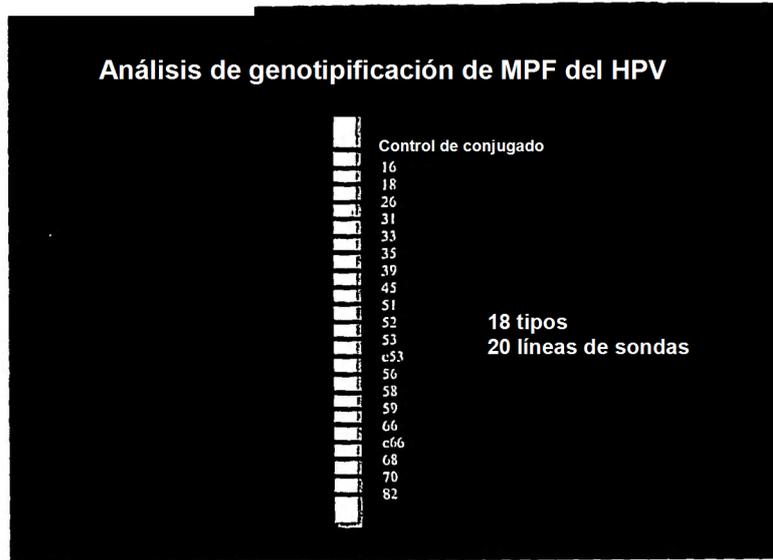


Figura 8

