

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 445**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/70** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05800781 .6**

96 Fecha de presentación: **13.07.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1771585**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.04.2007**

54

Título: **Composiciones y métodos para la detección de ácido nucleico del virus de la hepatitis A**

30

Prioridad:

**13.07.2004 US 587734 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

**10.12.2012**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**10.12.2012**

73

Titular/es:

**GEN-PROBE INCORPORATED (100.0%)  
PATENT DEPARTMENT, 10210 GENETIC CENTER  
DRIVE  
SAN DIEGO, CA 92121-4362, US**

72

Inventor/es:

**CARLSON, JAMES D. y  
BRENTANO, STEVEN T.**

74

Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 392 445 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para la detección de ácido nucleico del virus de la hepatitis A

**Campo de la invención**

5 Esta invención se refiere a la detección diagnóstica de un virus humano y específicamente se refiere a ensayos para detectar secuencias del virus humano de la hepatitis A, empleando la amplificación de ácido nucleico *in vitro* y la detección de secuencias amplificadas.

**Antecedentes de la invención**

10 El virus de la hepatitis A (VHA) es el agente causante de una forma de hepatitis que puede producir síntomas que incluyen fiebre, fatiga, náuseas, dolor abdominal, diarrea, pérdida de apetito e ictericia, durante menos de dos meses. De las personas infectadas con el VHA, aproximadamente del 10% al 15% tienen síntomas prolongados o recurrentes durante un período de seis a nueve meses después de la infección. Una inmunidad frente al VHA, basada en la producción individual de inmunoglobulina G (IgG) anti-VHA, es la consecuencia de las infecciones sintomáticas y asintomáticas.

15 Aunque la incidencia de infecciones por VHA se ha reducido drásticamente en algunas partes del mundo en donde la vacunación contra el VHA (por ejemplo, mediante el uso de VHA inactivado) se ha utilizado generalmente desde finales de 1990, pueden aparecer infecciones epidémicas por VHA (más de 700 casos por 100.000 habitantes) en poblaciones no inmunes, en donde hay condiciones sanitarias deficientes, aunque sean temporalmente, por ejemplo, después de un terremoto. El VHA se excreta en las heces de las personas infectadas y generalmente se transmite por vía fecal-oral. Los brotes extendidos en una población pueden ser consecuencia de la transmisión por alimentos  
20 que se produce cuando un manipulador de alimentos infectado con el VHA, contamina los alimentos durante su preparación, o cuando los materiales alimentarios se contaminan durante el cultivo, la cosecha, el envasado o el tratamiento en el sistema de distribución. La transmisión también puede resultar del contacto con el suero, productos sanguíneos contaminados con VAH o agujas contaminadas, por ejemplo, por transfusión o por el uso de fármacos inyectados. Las personas con riesgo de infección con el VHA incluyen las que tienen familia o contacto sexual con  
25 una persona infectada con el VHA, personas que tienen trastornos de los factores de coagulación (por ejemplo, hemofilia) o una enfermedad hepática crónica, personas que viajan a países en donde es común la hepatitis A, hombres que tienen relaciones sexuales con hombres, consumidores de drogas ilegales y niños que viven en zonas con índices elevados de hepatitis A (por ejemplo, >20 casos por 100.000 habitantes).

30 El VHA es un virus de ARN de 27-nm (picornavirus) que contiene un genoma de ARN monocatenario positivo de aproximadamente 7,5 kb, para el que se ha encontrado un único serotipo en todo el mundo. El VHA se replica en el hígado, se excreta en la bilis, y se elimina en las heces (hasta  $10^8$  virus por ml) durante la fase aguda de una infección. El período de incubación suele ser de dos a seis semanas antes de que aparezcan los síntomas. El diagnóstico de la hepatitis A no puede diferenciarse de otros tipos de hepatitis víricas, por los síntomas u otras características clínicas (por ejemplo, niveles elevados de aminotransferasas en suero). Típicamente, el diagnóstico de la hepatitis A se confirma mediante pruebas serológicas que proporcionan resultados positivos por la presencia  
35 de inmunoglobulinas (Ig) anti-VHA. La IgM anti-VHA generalmente se presenta cinco a diez días antes de la aparición de los síntomas y es indetectable en la mayoría de los pacientes hasta seis meses más tarde, mientras que la IgG anti-VHA aparece tempranamente durante la infección y sigue siendo detectable durante toda la vida del individuo. El ARN de VHA se puede detectar en la sangre y las heces de la mayoría de las personas durante la fase  
40 aguda de la infección, mediante el uso de métodos para someter a ensayo ácidos nucleicos, por ejemplo, la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y la secuenciación de ácidos nucleicos, que se ha utilizado para identificar la relación genética del VHA con posterioridad a infecciones extendidas en una población (Dato y col., *Morbidity Mortality Wkly. Rpt.*, 2003, 52(47): 1155-57; LaPorte y col., *Morbidity Mortality Wkly. Rpt.*, 2003, 52(24):565-67). Estos métodos, sin embargo, no se utilizan generalmente para fines de diagnóstico.

45 El documento de patente WO 03/106641 A (Chiron Corp., 24-12-2003) describe combinaciones de cebadores localizados en la 5'-UTR del genoma de VHA. El documento de patente WO 91/11534 A (US Health, 8-8-1991) describe cebadores localizados en 32-60 y 240-266 (pág. 9) y una sonda localizada en 161-187 (pág. 11). Fujiwara K. y col. (*Digestive Diseases and Sciences*, vol. 45, nº 12, páginas 2422-2427) describen cebadores que amplifican un fragmento localizado en 277-551. Costa-Mattioli M. y col. (*Journal of Viral Hepatitis*, vol. 9, nº 2, páginas 101-106)  
50 describen cebadores localizados en la posición 22 (directo) y 85-107 (inverso) y una sonda localizada en la posición 58.

55 En los EE.UU., cada año mueren aproximadamente 100 personas a causa de insuficiencia hepática aguda debida a la hepatitis A (tasa de mortalidad de aproximadamente 0,015%). Incluso en los casos no mortales de hepatitis A, hay unos costes sustanciales asociados con las infecciones por VHA, incluidos los costes de hospitalización del paciente, las visitas ambulatorias y los días de trabajo perdidos. Los costes en salud pública asociados con brotes de hepatitis A, incluyen la localización y administración de inmunoglobulina a las personas expuestas a un individuo infectado o a una fuente infecciosa (por ejemplo, agua o alimentos contaminados) hasta dos semanas después de la

exposición. El riesgo potencial de infección, sobre todo para brotes extendidos en una población puede provocar unos costes psicológicos importantes y pérdidas económicas. Debido a la relativa facilidad para transmitir el VHA en el agua y en alimentos contaminados, y la morbilidad asociada con la hepatitis A, el VHA es un agente potencial para uso en terrorismo biológico.

- 5 Existe una necesidad de detectar con precisión la presencia de VHA en muestras biológicas y ambientales. Existe una necesidad de diagnosticar rápidamente a los individuos infectados con VHA. Por ejemplo, ya que la inmunoglobulina para ser eficaz se debe administrar a una persona hasta dos semanas después de la exposición al VHA, existe una necesidad de un ensayo rápido y preciso para evaluar prontamente los manipuladores de alimentos con síntomas de hepatitis e informar a las agencias de salud pública de fuentes positivas para VHA. Existe una  
10 necesidad de detectar VHA presente en materiales contaminados, tales como el agua y los alimentos, para evitar brotes extendidos en poblaciones o epidemias, como resultado del uso o del consumo de estos materiales. También existe una necesidad de detectar la contaminación con VHA, en productos que se pueden utilizar en un tratamiento médico, por ejemplo, sangre o suero utilizado para transfusiones o para la preparación de factores obtenidos a partir de fluidos humanos
- 15 La presente invención responde a estas necesidades, divulgando secuencias de oligonucleótidos utilizadas en métodos para someter a ensayo el ácido nucleico para detectar la presencia de ácido nucleico de VHA en una muestra.

### Sumario

20 La invención incluye oligómeros de ácido nucleico, útiles para la purificación, amplificación y detección de secuencias diana de VHA. Tales oligómeros o combinaciones de oligómeros pueden estar contenidos en una configuración de kit, cuyas realizaciones pueden incluir oligómeros adicionales y/u otros reactivos para la amplificación y/o detección de una secuencia de VHA. La invención también incluye métodos para la detección de VHA en una muestra, que emplean las etapas de purificar el ácido nucleico de VHA a partir de otros componentes en la muestra, amplificar una secuencia diana de ARN de VHA o ADNc obtenido a partir del mismo, mediante el uso  
25 de una polimerasa de ácido nucleico *in vitro* y cualquier combinación de oligómeros para la amplificación, tal y como se describe en la presente memoria, para producir un producto amplificado, y la detección del producto amplificado empleando una sonda de detección que se hibrida específicamente con al menos una porción del producto amplificado. En una realización, el ácido nucleico de VHA se purifica empleando al menos un oligómero de captura que incluye una secuencia que se hibrida específicamente con una región diana del ARN de VHA, para formar un  
30 complejo de hibridación que incluye el ARN de VHA que se separa de otros componentes de la muestra.

Un aspecto descrito es una combinación de al menos dos oligómeros específicos para amplificar una región diana de VHA, que incluye: para una primera región diana de VHA, oligómeros de aproximadamente 23 a 26 nt, contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 138, que incluyen por lo menos la secuencia de SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 140, u oligómeros con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 19 a 25 nt contenidos en la  
35 secuencia de SEQ ID NO: 141, que contienen al menos una secuencia de SEQ ID NOs 142 a 146, u oligómeros cebadores promotores con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 50 a 53 nt, que incluyen porciones específicas de una diana de VHA de una cualquiera entre SEQ ID NOs 21 a 27; para una segunda región diana de VHA, oligómeros desde aproximadamente 21 a 27 nt, contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 60 o contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 86, que incluyen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 156, o  
40 oligómeros cebadores promotores con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 48 a 54 nt, que incluyen porciones específicas de una diana de VHA de una cualquiera entre SEQ ID NOs 29 a 32; para una tercera región diana de VHA, oligómeros de aproximadamente 24 a 30 nt, contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 147, que incluyen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 148, o contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 157 que incluyen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 158, u oligómeros cebadores promotores que incluyen porciones  
45 específicas de una diana de VHA de SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32; para una cuarta región diana de VHA, oligómeros desde aproximadamente 18 a 27 nt, contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 93 o SEQ ID NO: 95, que contienen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 159 o SEQ ID NO: 160, o un oligómero cebador promotor que incluye una porción específica de una diana de VHA de SEQ ID NO: 33; para una quinta región diana de VHA, oligómeros desde aproximadamente 19 a 31 nt, contenidos en la secuencia de SEQ ID NO:  
50 149 que incluyen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 150, u oligómeros cebadores promotores con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 51 a 56 nt, que incluyen porciones específicas de una diana de VHA de una cualquiera entre SEQ ID NOs 34 a 40; para una sexta región diana de VHA, oligómeros desde aproximadamente 24 a 28 nt, contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 161 que incluyen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 162, u oligómeros cebadores promotores son realizaciones de cebadores promotores que incluyen  
55 porciones específicas de una diana de VHA de SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42; y para una séptima región diana de VHA, oligómeros desde aproximadamente 20 a 30 nt, contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 151 que incluyen al menos una cualquiera entre las secuencias SEQ ID NO: 152 a SEQ ID NO: 155, o contenidos en SEQ ID NO: 163 que incluyen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 164, o contenidos en SEQ ID NO: 165 que incluyen al menos una cualquiera entre las secuencias SEQ ID NOs 166 a 168, u oligómeros cebadores promotores con un  
60 tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 51 a 56 nt, que incluyen porciones específicas de una diana de VHA de una cualquiera entre SEQ ID NOs 43 a 49. Las realizaciones preferidas de combinaciones de al menos

5 dos oligómeros específicos de la primera región diana de VHA, se seleccionan entre SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144 y SEQ ID NO: 145. Las realizaciones preferidas de combinaciones de al menos dos oligómeros específicos de la segunda región diana de VHA se seleccionan entre SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 y SEQ ID NO: 156.

10 Las realizaciones preferidas de combinaciones de al menos dos oligómeros específicos de la tercera región diana de VHA se seleccionan entre SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91 y SEQ ID NO: 148. Las realizaciones preferidas de combinaciones de al menos dos oligómeros específicos de la cuarta región diana de VHA, se seleccionan entre SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96 y SEQ ID NO: 97. Las realizaciones preferidas de combinaciones de al menos dos oligómeros específicos de la quinta región diana de VHA se seleccionan entre SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 149 y SEQ ID NO: 150. Las combinaciones preferidas de al menos dos oligómeros específicos de la sexta región diana de VHA, se seleccionan entre SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 161 y SEQ ID NO: 162. Las combinaciones preferidas de al menos dos oligómeros específicos de la séptima región diana de VHA, se seleccionan entre SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167 y SEQ ID NO: 168. Otras realizaciones preferidas incluyen, además, al menos un oligómero de una sonda de captura, seleccionado entre SEQ ID NOs 1 a 14. Aún otras realizaciones incluyen, además, al menos un oligómero de una sonda de detección seleccionado entre SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121 a SEQ ID NO: 124, y SEQ ID NO: 126 a SEQ ID NO: 130. Las realizaciones preferidas de combinaciones de oligómeros incluyen por lo menos dos oligómeros específicos para amplificar una región diana de VHA seleccionada y al menos un oligómero de una sonda de detección que es específico de una secuencia contenida en la secuencia genómica de VHA, situada entre los dos oligómeros seleccionados, específicos para amplificar la región diana seleccionada de VHA. Las realizaciones preferidas de tales combinaciones de oligómeros se pueden envasar juntas en un kit, que puede contener además otros reactivos, tales como reactivos utilizados en la purificación del ARN de VHA a partir de una muestra, y/o reactivos utilizados en la amplificación *in vitro* de ácido nucleico, y/o reactivos utilizados para producir una señal detectable a partir de un oligómero de una sonda de detección.

Otro aspecto es un método para detectar la presencia de VHA en una muestra que incluye las etapas de purificar el ácido nucleico de VHA a partir de otros componentes en una muestra que contiene VHA; amplificar una secuencia diana de VHA en el ácido nucleico purificado de VHA, o un ADNc obtenido a partir del mismo, empleando una reacción de amplificación *in vitro* que incluye al menos dos oligómeros de la amplificación, específicos de una región diana seleccionada de VHA, que incluyen: para una primera región diana de VHA, oligómeros desde aproximadamente 23 a 26 nt contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 138, que incluyen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 140, u oligómeros con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 19 a 25 nt, contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 141, que contienen al menos una secuencia entre SEQ ID NOs 142 a 146, u oligómeros cebadores promotores con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 50 a 53 nt que incluyen porciones específicas de una diana de VHA de una cualquiera entre SEQ ID NOs 21 a 27; para una segunda región diana de VHA, oligómeros de aproximadamente 21 a 27 nt contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 60 o contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 86, que incluyen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 156, u oligómeros cebadores promotores con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 48 a 54 nt, que incluyen porciones específicas de una diana de VHA de una cualquiera entre SEQ ID NOs 29 a 32; para una tercera región diana de VHA, oligómeros desde aproximadamente 24 a 30 nt, contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 147 que incluyen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 148, o contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 157 que incluyen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 158, u oligómeros cebadores promotores que incluyen porciones específicas de una diana de VHA de SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32; para una cuarta región diana de VHA, oligómeros desde aproximadamente 18 a 27 nt, contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 93 o SEQ ID NO: 95, que contienen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 159 o SEQ ID NO: 160, o un oligómero cebador promotor que incluye una porción específica de una diana de VHA de SEQ ID NO: 33; para una quinta región diana de VHA, oligómeros desde aproximadamente 19 a 31 nt, contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 149 que incluyen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 150, u oligómeros cebadores promotores con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 51 a 56 nt que incluyen porciones específicas de una diana de VHA de cualquiera entre SEQ ID NOs 34 a 40; para una sexta región diana de VHA, oligómeros desde aproximadamente 24 a 28 nt, contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 161 que incluyen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 162, u oligómeros cebadores promotores son realizaciones de cebadores promotores que incluyen porciones específicas de una diana de VHA de SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42; y para una séptima región diana de VHA, oligómeros

desde aproximadamente 20 a 30 nt, contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 151, que incluyen al menos una cualquiera entre las secuencias SEQ ID NO: 152 a SEQ ID NO: 155, o contenidos en SEQ ID NO: 163 que incluyen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 164, o contenidos en SEQ ID NO: 165 que incluyen al menos una cualquiera entre las secuencias SEQ ID NOs 166 a 168, u oligómeros cebadores promotores con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 51 a 56 nt que incluyen porciones específicas de una diana de VHA de una cualquiera entre SEQ ID NOs 43 a 49, para producir un producto amplificado de la región diana seleccionada de VHA; y para detectar el producto amplificado empleando una sonda de detección que se hibrida específicamente con al menos una porción del producto amplificado. En una realización preferida en la etapa de purificación, se pone en contacto la muestra con al menos un oligómero de una sonda de captura que comprende una secuencia contenida en una cualquiera entre las SEQ ID NOs 1 a 14, que se hibrida específicamente a una secuencia en el ARN de VHA para formar un complejo de hibridación con el ARN de VHA, y se separa el complejo de hibridación que contiene el ARN de VHA, de otros componentes de la muestra. En realizaciones preferidas en las que se amplifica una secuencia en la primera región diana de VHA, se emplean al menos dos oligómeros específicos de la primera región diana de VHA, seleccionados entre SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144 y SEQ ID NO: 145; y a continuación se emplea al menos una sonda de detección que se hibrida específicamente con el producto amplificado de la primera región diana de VHA. En realizaciones preferidas en donde se amplifica una secuencia en la segunda región diana de VHA, se emplean al menos dos oligómeros específicos de la segunda región diana de VHA, seleccionados entre SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 y SEQ ID NO: 156; y a continuación, se emplea al menos una sonda de detección que se hibrida específicamente con el producto amplificado de la segunda región diana de VHA. En realizaciones preferidas en las que se amplifica una secuencia en la tercera región diana de VHA, se emplean al menos dos oligómeros específicos de la tercera región diana de VHA, seleccionados entre SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91 y SEQ ID NO: 148; y a continuación se emplea al menos una sonda de detección que se hibrida específicamente con el producto amplificado de la región diana de VHA. En realizaciones preferidas en las que se amplifica una secuencia en la cuarta región diana de VHA, se utilizan al menos dos oligómeros específicos de la cuarta región diana de VHA seleccionados entre SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96 y SEQ ID NO: 97; y a continuación se emplea al menos una sonda de detección que se hibrida específicamente con el producto amplificado de la cuarta región diana de VHA. En realizaciones preferidas en las que se amplifica una secuencia en la quinta región diana de VHA, se emplean al menos dos oligómeros específicos de la quinta región diana de VHA, seleccionados entre SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 149 y SEQ ID NO: 150; y posteriormente se emplea al menos una sonda de detección que se hibrida específicamente con el producto amplificado de la quinta región diana de VHA. En realizaciones preferidas en las que se amplifica una secuencia en la sexta región diana de VHA, se emplean al menos dos oligómeros específicos de la sexta región diana de VHA, seleccionados entre SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 161 y SEQ ID NO: 162; y a continuación se utiliza al menos una sonda de detección que se hibrida específicamente con el producto amplificado de la sexta región diana de VHA. En realizaciones preferidas en las que se amplifica una secuencia en la séptima región diana de VHA, se utilizan al menos dos oligómeros específicos de la séptima región diana de VHA, seleccionados entre SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167 y SEQ ID NO: 168; y a continuación se emplea al menos una sonda de detección que se hibrida específicamente con el producto amplificado de la séptima región diana de VHA.

### Descripción detallada

La presente invención incluye métodos de detección de VHA presente en muestras que pueden ser muestras biológicas obtenidas a partir de seres humanos (por ejemplo, heces, sangre, saliva, suero u orina), muestras ambientales (por ejemplo, agua, suelo) u otros materiales (por ejemplo, alimentos) que están potencialmente contaminados con VHA. Los métodos se basan en la detección de la presencia de secuencias de ácido nucleico de VHA, mediante la amplificación *in vitro* de una región del genoma de VHA y la detección del ácido nucleico amplificado mediante el uso de una sonda que se une específicamente a una secuencia en el ácido nucleico amplificado. Una realización del método incluye una etapa de aislar o purificar el ácido nucleico de VHA a partir de una muestra, antes de la etapa de amplificación de una región del genoma de VHA. En esta realización se aísla ARN genómico de VHA mediante el uso de un oligómero de captura que se une específicamente a una secuencia en el genoma de VHA, preferiblemente fuera de la región del genoma de VHA que se amplifica, y la separación del complejo formado por el oligómero de captura y el ARN de VHA unido, de otros componentes de la muestra

empleando un soporte de captura, tal como una partícula a la que también se une el oligómero de captura. En la amplificación de una porción de la secuencia genómica de VHA, se utiliza uno o varios oligómeros de amplificación que se unen específicamente al ARN de VHA o a una secuencia complementaria, y la síntesis enzimática *in vitro* para realizar copias adicionales de una porción de la secuencia genómica de VHA o una secuencia complementaria, mediante el uso de oligómeros de amplificación como cebadores para la síntesis de las copias adicionales. Una realización preferida utiliza una reacción de amplificación isotérmica para hacer copias adicionales de una porción de la secuencia genómica de VHA. La secuencia de VHA amplificada se detecta a continuación por la unión específica de uno o varios oligómeros de la sonda con el ácido nucleico amplificado, y la detección de una señal que es el resultado del oligómero de una sonda unido a la secuencia amplificada. La detección de una señal resultante del oligómero de una sonda unido a la secuencia de VHA amplificada, indica la presencia de VHA en la muestra. Estos métodos son útiles para detectar la presencia de VHA en una variedad de muestras, tales como muestras biológicas utilizadas para diagnosticar una infección con VHA en un ser humano, o muestras ambientales contaminadas con VHA, para evitar la propagación del VHA como resultado del uso o consumo de la fuente contaminada. Estos métodos también son útiles para el análisis de muestras de fluidos humanos para estudiar la presencia de VHA, tales como suero o plasma, para evitar posteriores infecciones con VHA como resultado del uso del fluido humano en una transfusión o para la preparación de factores terapéuticos. Los métodos de la presente invención también son útiles para detectar en tejidos u órganos humanos la presencia de VHA, para impedir su uso en terapia de trasplantes. Por lo tanto, estos métodos son especialmente importantes para la detección de una contaminación con VHA en muestras humanas o en productos obtenidos a partir de tejido humano.

La presente invención abarca composiciones de ácido nucleico, tales como oligómeros que se hibridan específicamente con ARN de VHA o ácidos nucleicos obtenidos a partir de ARN de VHA, por ejemplo, ADNc o secuencias amplificadas preparadas a partir de ARN de VHA. Una de estas composiciones es un oligómero de captura utilizado para purificar ARN de VHA a partir de una mezcla compleja, tal como una muestra, mediante hibridación específica con el ARN de VHA y fijando el ARN de VHA hibridado a un soporte de captura que permite la separación del ARN de VHA capturado de otros componentes de la muestra. El método de purificación que utiliza tal oligómero de captura, se denomina generalmente captura de una diana, en donde el ARN de VHA es el ácido nucleico diana específico. Otro oligómero de la invención es un oligómero de la amplificación de ácido nucleico (a veces mencionado como un cebador). Realizaciones adicionales incluyen oligómeros de sonda que se hibridan específicamente con ARN de VHA o secuencias de ácido nucleico de VHA amplificadas para proporcionar una señal que detecta la presencia de una secuencia específica de VHA. Estas secuencias de ácido nucleico son útiles para la captura, amplificación y detección de secuencias específicas de VHA y, por lo tanto, actúan juntas para detectar la presencia de VHA en una muestra.

Una muestra incluye cualquier líquido que puede contener VHA o cualquier sólido que pueda contener o tener VHA en la superficie. Las muestras incluyen, por ejemplo, las procedentes de fuentes ambientales tales como agua, fuentes biológicas tales como fluidos humanos o desechos, y alimentos, materiales para el envasado, u otros componentes utilizados en el procesamiento de alimentos. Una muestra biológica incluye cualquier tejido o material obtenido a partir de un ser humano vivo o muerto, que puede contener VHA o ácido nucleico de VHA, incluyendo, por ejemplo, saliva, sangre, plasma, suero, tejido de biopsia, tejido gastrointestinal, orina, heces u otros fluidos, tejidos o materiales corporales. Una muestra se puede tratar para destruir física o mecánicamente su estado físico para liberar partículas de VHA o ARN de VHA, en una solución acuosa o un disolvente, empleando métodos convencionales.

Los ácidos nucleicos incluyen ADN o un análogo del mismo, ARN o un análogo del mismo, o polímeros u oligómeros mixtos de ARN-ADN, formados por al menos dos, y preferiblemente diez o más bases unidas por una estructura de cadena principal. El ADN y el ARN pueden estar compuestos por las bases comunes (A, T, G y C para el ADN, y A, G, C y U para el ARN), aunque los análogos de bases (por ejemplo, inosina) y las posiciones abásicas (es decir, una cadena principal de fosfodiéster que carece de un nucleótido en una o varias posiciones, véase el documento de patente de EE.UU. n° 5.585.481) también están incluidos en estos términos. Los polímeros pueden tener una longitud de muchos cientos o miles de nucleótidos, mientras que los oligómeros generalmente se refieren a ácidos nucleicos de 1000 o menos nucleótidos enlazados, y comprenden frecuentemente desde dos hasta aproximadamente 100 nucleótidos unidos. Los oligómeros, generalmente, tienen un tamaño dentro de un intervalo que tiene un límite inferior de aproximadamente 10 bases y un límite superior de aproximadamente 150 bases, preferiblemente un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 15 a aproximadamente 70 bases. Los oligómeros se pueden purificar a partir de fuentes biológicas de origen natural, pero preferiblemente se sintetizan *in vitro* usando cualquiera entre una variedad de métodos enzimáticos o químicos bien conocidos (por ejemplo, Caruthers y col., 1987, *Methods in Enzymol.*, 154:287).

Una cadena principal de ácido nucleico se refiere a grupos o enlaces conocidos en la técnica (Eschenmoser, 1999, *Science* 284:2118-2124), por ejemplo, enlaces azúcar-fosfodiéster, enlaces 2'-O-metilo, enlazadores de guanidina en el ADN ("DNG"), enlazadores de S-metiltiourea, enlaces de metilfosfonato, enlaces de fosforamidoato, modificaciones en la amida de la cadena principal, tales como en ácidos nucleicos de poliamida o peptídicos (PNA), enlaces fosforotioato, enlaces de éster fosfónico de ácido nucleico, enlaces de oligonucleótidos de piranosilo, enlaces de ácido nucleico biciclo y triciclo, enlaces de formacetal y 3'-tioformacetal, enlaces morfolino, u otras

modificaciones del enlace fosfodiéster internucleósido natural, o combinaciones de los mismos (Majlessi y col., 1998, *Nucl. Acids Res.* 26(9):2224-2229; Dempcy y col., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:6097-6101; Browne y col., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:7051-7055; Arya y Bruice, 1998, *J. Am. Chem. Soc.* 120:6619-6620; Reynolds y col., 1996, *Nucl. Acids Res.* 24(22):4584-4591; Gryaznov y Chen, 1994, *Am. Chem. Soc.* 116:3143-3144; Chaturvedi y col., 1996, *Nucl. Acids Res.* 24(12):2318-2323; Hyrup y Nielsen, 1996, *Bioorg. & Med. Chem.* 4:5-23; Hydig-Hielsen y col., documento de Solicitud de Patente PCT WO 95/32305; Mesmaecker y col., *Syn. Lett.*, Noviembre 1997:1287-1290; Peyman y col., 1996, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35(22):2636-2638; Aerschot y col., 1995, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34(12):1338-1339; Koshkin y col., 1998, *J. Am. Chem. Soc.* 120:13252-13253; Steffens y Leumann, 1997, *J. Am. Chem. Soc.* 119:11548-11549; Jones y col., 1993, *J. Org. Chem.* 58:2983-2991; Summerton y Weller, 1997, *Antisense & Nucl. Acid Drug Dev.* 7:187-195; Stirchak y col., 1989, *Nucl. Acids Res.* 17(15):6129-6141). Una cadena principal de ácido nucleico puede incluir una mezcla de enlaces en el mismo oligómero o polímero (por ejemplo, uno o varios enlaces azúcar-fosfodiéster y uno o varios enlaces 2'-O-metilo en la hebra) o puede tener los mismos enlaces a lo largo de la hebra (por ejemplo, todos los enlaces 2'-O-metilo o todos los enlaces de modificación de amida).

Una diana, una secuencia diana o un ácido nucleico diana pueden referirse a una secuencia grande (por ejemplo, mayor que 1000 nt) o a una secuencia más pequeña dentro de un ácido nucleico más grande, a la que se une otra secuencia, por ejemplo, empleando el emparejamiento convencional de bases complementarias. Un ácido nucleico diana puede ser ARN o ADN, de origen natural o sintético. Por ejemplo, una diana puede ser un ácido nucleico relativamente grande, tal como el genoma de VHA, o una diana puede ser una subsecuencia menor contenida en el ARN de VHA, su complemento, o un producto de la amplificación preparado a partir de la misma, que se une específicamente a otra secuencia en un oligómero. Los expertos en la técnica apreciarán que un ácido nucleico diana puede existir en cualquier forma, por ejemplo, una hebra codificadora o no codificadora (+ o -).

Los ácidos nucleicos complementarios (o complementariedad del ácido nucleico) se refiere a una secuencia de bases en una hebra de ácido nucleico que, debido a la orientación de sus grupos funcionales, se une a una secuencia de bases en una hebra opuesta, por ejemplo, mediante puentes de hidrógeno entre las bases A y T o U, y entre las bases C y G. Sustancialmente complementaria significa que una secuencia de bases de una hebra no es completa o perfectamente complementaria a una secuencia de bases en una hebra opuesta, pero existen suficientes enlaces entre las bases de las dos hebras para formar un complejo hibridado estable con un conjunto de condiciones (por ejemplo, la concentración salina en una solución acuosa, o una temperatura). Tales condiciones se pueden predecir mediante el uso de las secuencias de bases y cálculos matemáticos convencionales, conocidos por los expertos en la técnica, para determinar la temperatura de fusión ( $T_m$ ) en la que 50% de las hebras hibridadas se desnaturalizan, o mediante la determinación empírica de la  $T_m$  utilizando métodos de rutina (por ejemplo, véase Sambrook y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª ed., (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989), en 9.50-51, 11.46-49, 11.55-57).

Una condición de hibridación se refiere al entorno combinado en el que una hebra de ácido nucleico se une a una segunda hebra de ácido nucleico por medio de interacciones de la hebra complementaria, para producir un complejo de hibridación. Tales condiciones incluyen, por ejemplo, la temperatura, los componentes químicos y las concentraciones de los compuestos (por ejemplo, sales, tampones, agentes quelantes, compuestos orgánicos) en soluciones acuosas y/u orgánicas que contienen los ácidos nucleicos. Otros factores, tales como el tiempo de incubación o las dimensiones de la cámara de reacción, pueden contribuir a las condiciones de hibridación, que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, véase Sambrook y col., *id.*, en 1.90-1.91, 9.47-9.51, 11.47-11.57).

Un marcador se refiere a un resto molecular que es detectable o produce una respuesta detectable directa o indirectamente, por ejemplo, al catalizar una reacción que produce una señal. Los marcadores incluyen restos luminiscentes (por ejemplo, compuestos fluorescentes, bioluminiscentes o quimioluminiscentes), radioisótopos, miembros de parejas de unión (por ejemplo, biotina y avidina o estreptavidina), enzimas o sustratos enzimáticos, grupos reactivos, o cromóforos, por ejemplo, un colorante o una partícula que produce un color detectable. Una respuesta detectable o una señal es cualquier dato perceptible o medible que indica la presencia de un marcador, por ejemplo, luz, color, emisión de desintegración radiactiva, señal eléctrica, campo magnético o bloqueo de la señal, tal como de extinción o turbidez.

Un oligómero o una sonda inmovilizados se refieren a un oligómero que está conectado o fijado, covalente o no covalentemente, a una matriz de soporte de la captura, que proporciona un medio para unir un híbrido de la captura que contiene un ácido nucleico diana, al soporte de la captura. Una sonda inmovilizada preferida es un oligómero que se une, directa o indirectamente, a un ácido nucleico diana para facilitar la separación del ácido nucleico diana unido, de los materiales de la muestra no unidos. En una realización, la diana se une indirectamente a la sonda inmovilizada a través de una sonda de captura que une la diana y la sonda inmovilizada, en un complejo de hibridación (véanse los documentos de patente de EE.UU. nº 6.110.678 y 6.280.952, Weisburg y col.). Se puede utilizar cualquiera entre una variedad de soportes, tales como matrices o partículas hechas de, por ejemplo, nitrocelulosa, nailon, vidrio, poliacrilato, polímeros mezclados, poliestireno, polipropileno silano y materiales magnéticos. Las partículas magnéticas monodispersas de tamaño relativamente uniforme que se pueden recuperar fácilmente desde la solución, aplicando un campo magnético, son una realización preferida de un soporte.

Un oligómero o una sonda de captura unen un ácido nucleico diana y una sonda inmovilizada, es decir, mediante el uso de un resto específico de una diana que se une a la secuencia diana y un resto que fija la sonda de captura a una sonda inmovilizada. En una realización, ambas fijaciones son el resultado de la hibridación de secuencias de bases complementarias, es decir, la hibridación de una secuencia diana con una secuencia de una sonda de captura que es complementaria de una diana, y la hibridación de otra porción de la sonda de captura con una secuencia complementaria de la sonda inmovilizada. En otras realizaciones, se pueden producir una o varias fijaciones mediante el uso de los miembros de una pareja de unión específica (por ejemplo, biotina y avidina o estreptavidina), que son bien conocidos en la técnica. Se conocen composiciones y métodos que utilizan sondas de captura (documento de patente de EE.UU. nº 6.110.678).

Separación o purificación se refiere a la eliminación de uno o varios componentes de una muestra, de otros componentes de la muestra. Los componentes de la muestra incluyen ácidos nucleicos en una fase en solución generalmente acuosa que pueden incluir también materiales tales como proteínas, carbohidratos, lípidos y otros compuestos. Preferiblemente, la separación o la purificación de un ácido nucleico elimina al menos aproximadamente 70%, más preferiblemente al menos aproximadamente 90% y, aún más preferiblemente, al menos aproximadamente 95% del ácido nucleico procedente de otros componentes de la muestra.

Un oligonucleótido u oligómero de la amplificación se refiere a un oligómero que se hibrida con un ácido nucleico diana, o su secuencia complementaria, y que participa en una reacción de amplificación del ácido nucleico, al servir como cebador para la síntesis de ácido nucleico *in vitro*. Los oligómeros de la amplificación pueden contener otras secuencias funcionales, tales como una secuencia de promotor que se une a una polimerasa de ARN en un oligómero denominado cebador promotor. Un oligonucleótido de la amplificación contiene generalmente al menos aproximadamente 10 bases contiguas, preferiblemente al menos aproximadamente 12 bases contiguas, que son complementarias a una secuencia diana (o una hebra complementaria de la misma). Las bases contiguas son preferiblemente al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, y más preferiblemente aproximadamente 100% complementarias a la secuencia que se une al oligómero de la amplificación. Un oligómero de la amplificación puede ser ARN, ADN o ARN-ADN mezclados, y opcionalmente puede incluir nucleótidos modificados o enlaces con la cadena principal.

Un cebador se refiere a un oligonucleótido que se hibrida con un ácido nucleico molde y que tiene un extremo (generalmente 3') que se puede extender en una reacción de polimerización, catalizada por una enzima. La región 5' del cebador puede no ser complementaria al ácido nucleico diana, por ejemplo, como en un cebador promotor que incluye una secuencia 5' promotora que no está presente en la secuencia diana. Los expertos en la técnica apreciarán que un cebador promotor puede actuar como un cebador independientemente de su secuencia promotora (es decir, con o sin la secuencia promotora) y que cualquier oligómero de la amplificación se puede modificar para incluir una secuencia 5' promotora, y por tanto actúa como un cebador promotor.

La amplificación se refiere a cualquier procedimiento conocido para obtener múltiples copias de una secuencia diana, su complemento o fragmentos de los mismos. La amplificación de fragmentos se refiere a la producción de un ácido nucleico amplificado que contiene menos de la secuencia de ácido nucleico diana completa o su complemento, por ejemplo, la amplificación de una porción del genoma completo de VHA. La amplificación de un fragmento o una porción de la diana completa, puede resultar del uso de un oligómero de la amplificación que se hibrida e inicia la polimerización desde una posición interna del ácido nucleico diana. Los métodos conocidos para la amplificación incluyen, por ejemplo, la amplificación mediada por transcripción (TMA), la amplificación mediada por replicasa, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) y la amplificación por desplazamiento de la cadena (SDA). La amplificación mediada por replicasa utiliza moléculas de ARN auto-replicas y una replicasa, tal como la replicasa QB (por ejemplo, documento de patente de EE.UU. nº 4.786.600 de Kramer y col.). La PCR utiliza una ADN polimerasa, cebadores múltiples y la ciclación térmica para sintetizar muchas copias de dos hebras complementarias de ADN o ADNc (por ejemplo, documentos de patentes de EE.UU. nº 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159 de Mullis y col.). La LCR utiliza por lo menos cuatro oligómeros separados para amplificar una diana y su cadena complementaria mediante el uso de múltiples ciclos de hibridación, ligación y desnaturalización (por ejemplo, documento de patente de EE.UU. nº 5.427.930 de Biekenmeyer y col., y 5.494.810 de Barany y col.). La SDA usa un cebador que contiene un sitio de reconocimiento para una endonucleasa de restricción y la endonucleasa hace una muesca en una hebra de un dúplex de ADN semimodificado que incluye la secuencia diana, seguido por una serie de etapas de extensión del cebador y desplazamiento de la cadena (por ejemplo, documento de patente de EE.UU. nº 5.422.252 de Walker y col.). Las reacciones de amplificación mediadas por la transcripción o asociadas a la transcripción utilizan una polimerasa para sintetizar una cadena complementaria a la diana en forma bicatenaria, que contiene un promotor funcional para una polimerasa de ARN específica que produce transcritos que se pueden ciclar de forma isotérmica, para producir copias adicionales de transcritos que son productos de la amplificación detectables.

La amplificación mediada por la transcripción o asociada a la transcripción utiliza una polimerasa de ARN para producir múltiples transcritos de ARN a partir de un molde de ácido nucleico en reacciones isotérmicas que utilizan una polimerasa de ARN, una polimerasa de ADN, trifosfatos de desoxirribonucleósidos, trifosfatos de ribonucleósidos y un cebador-promotor, y pueden incluir opcionalmente uno o varios oligonucleótidos adicionales. Estos métodos de amplificación y las condiciones de la reacción se han descrito con detalle previamente (por

ejemplo, véanse los documentos de patente de EE.UU. nº 5.399.491 y 5.554.516 de Kacian y col., nº 5.437.990 de Burg y col., las patentes PCT WO 88/01302 y WO 88/10315 de Gingeras, la patente de EE.UU. nº 5.130.238 de Malek y col., y las patentes de EE.UU. nº 4.868.105 y 5.124.246 de Urdea y col.).

5 Las realizaciones preferidas de la presente invención emplean la amplificación mediada por transcripción (TMA, descrita en los documentos de patente de EE.UU. nº 5.399.491 y 5.554.516). Para un experto en la técnica será evidente, sin embargo, que los métodos y las secuencias de cebadores oligonucleótidos descritos en la presente memoria son fácilmente aplicables para usar con cualquier método de amplificación de ácido nucleico que extiende sintéticamente los cebadores mediante el uso de una polimerasa.

10 Una sonda de detección es un oligómero que se une a una secuencia diana específica y, mediante la unión, produce directa o indirectamente, una señal detectable que indica la presencia de la secuencia diana. Una sonda de detección no tiene que estar marcada para producir una señal detectable, tal como un impulso eléctrico que se produce por la unión de la sonda a la diana. Una sonda marcada se compone de un oligómero que está unido, directa o indirectamente, a un marcador. Los métodos para preparar y/o utilizar sondas marcadas, son bien conocidos (por ejemplo, Sambrook y col., *id.*, cap. 10; documentos de patente de EE.UU. nº 6.361.945 de Becker y col., 5.658.737 de Nelson y col., 5.656.207 de Woodhead y col., 5.547.842 de Hogan y col., 5.283.174 de Arnold y col., 4.581.333 de Kourilsky y col. y 5.731.148 de Becker y col.). Las sondas de detección pueden incluir un enlazador sintético (documentos de patente de EE.UU. nº 5.585.481 y 5.639.604 de Arnold y col.), y un marcador quimioluminiscente, tal como un compuesto de éster de acridinio (AE) (documentos de patente de EE.UU. nº 5.185.439, 5.656.207 y 5.658.737).

20 Un marcador detectable homogéneo es un marcador que se puede detectar de una manera homogénea en función de si el marcador está unido o no a una diana. Es decir, la detección de un marcador en una reacción homogénea no requiere la separación física de las formas no unidas del marcador, desde la mezcla en la que se detecta la señal. Los expertos en la técnica apreciarán que una reacción homogénea puede tener lugar en solución o sobre un soporte, por ejemplo, una matriz, un biochip o un chip génico. Los marcadores detectables homogéneos y las condiciones para su detección son bien conocidos (por ejemplo, documentos de patente de EE.UU. nº 5.283.174, 5.656.207 y 5.658.737).

30 "Consiste esencialmente en" significa que el(los) componente(s), la(s) composición(es) o la(s) etapa(s) del método adicional(es), que no cambian materialmente las características básicas y novedosas de la presente invención, se pueden incluir en las composiciones, kits o métodos de la presente invención. Tales características incluyen la capacidad de detectar específicamente la presencia de ácido nucleico de VHA en una muestra con una sensibilidad de al menos 80%, para las muestras que contienen de 25 a 30 copias de VHA por ml, mediante el uso de una combinación de sonda de captura, cebadores de la amplificación y oligómeros de la sonda de detección, tal y como se describen en esta memoria. Cualquier componente(s), composición(es) o etapa(s) del método que tenga un efecto material sobre la especificidad y/o sensibilidad de la detección del VHA presente en una muestra, empleando los oligómeros de ácido nucleico y los métodos *in vitro* descritos en este documento, estarían excluidos de esta expresión.

40 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en esta memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por los expertos en la técnica relevante. Las definiciones de muchos de los términos utilizados en esta memoria se proporcionan, por ejemplo, en *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 2ª ed. (Singleton y col., 1994, John Wiley & Sons, New York, NY), *The Encyclopedia of Molecular Biology* (Kendrew, compilador, 1994, Blackwell Science Ltd., Cambridge, MA), o *The Harper Collins Dictionary of Biology* (Hale & Marham, 1991, Harper Perennial, New York, NY). A menos que se mencione lo contrario, las técnicas empleadas o contempladas en esta memoria son metodologías convencionales bien conocidas por un experto normal en la técnica. Los ejemplos se incluyen para ilustrar algunas realizaciones de la invención.

45 La presente invención incluye composiciones (oligómeros de la amplificación de ácido nucleico, sondas de detección y opcionalmente oligómeros de captura) y métodos para detectar ácido nucleico de VHA en una muestra. Para seleccionar las secuencias adecuadas para uso como los oligómeros descritos en esta memoria, secuencias genómicas conocidas de VHA (Beneduce y col., 1995, *Virus Res.* 36(2-3): 299-309, Fujiwara y col., 2001, *J. Hepatol.* 35(1): 112-119, Hu y col., 2002, *Acta Virol.* 46(3): 153-157), que incluyen las de diferentes materiales aislados, secuencias parciales y las secuencias complementarias disponibles en una base de datos pública (por ejemplo, GenBank, nº de entrada AB020564 a AB020569) se alinearon, haciendo coincidir las regiones de secuencias idénticas o similares y las secuencias alineadas se compararon usando técnicas bien conocidas. Aunque las comparaciones de secuencias se pueden facilitar mediante el uso de algoritmos, los expertos en la técnica pueden realizar tales comparaciones de forma manual y visual. Las porciones de secuencias de VHA que contienen variantes de secuencia relativamente escasas, entre las secuencias comparadas, se eligieron como base para el diseño de oligómeros sintéticos adecuados para uso en las etapas de captura, amplificación y detección, descritas en la presente memoria. Otras características bien conocidas de la secuencia, tales como el contenido en GC y la abundancia relativa de estructuras secundarias previstas (por ejemplo, vueltas de la horquilla o emparejamiento intramolecular), también se consideraron en la selección de las secuencias de oligómeros.

Basándose en estos análisis, las regiones del genoma de VHA alrededor de los nucleótidos 200, 3700, 4700, 5700, 5800, 6000 y 7000, se escogieron como regiones diana potenciales para la detección de secuencias amplificadas de VHA. Para cada región, se diseñaron oligómeros para uso en la captura del ARN de VHA a partir de una muestra, para purificarlo de otros componentes de la muestra, tales como oligómeros de la amplificación y secuencias de la sonda. Las realizaciones preferidas de las regiones diana están en porciones de los nt 0 a 305, nt 4714 a 4765, nt 5495 a 5788, nt 5788 a 6069 y nt 6952 a 7413 del genoma de VHA.

Las secuencias de oligómeros de captura generalmente incluyen una secuencia que se une específicamente a una secuencia cercana a la región diana que se va a amplificar y una región de "cola" utilizada en la fijación del complejo de hibridación que incluye la diana a un soporte sólido, por ejemplo, mediante la hibridación con un oligómero inmovilizado (por ejemplo, documento de patente de EE.UU. n° 6.110.678). Los oligómeros de captura preferidos incluyen una secuencia específica de una diana que se une específicamente a una secuencia de ARN de VHA y una secuencia de la cola fijada covalentemente (por ejemplo, dT<sub>3</sub>dA<sub>30</sub>), tal y como se muestra en SEQ ID NOS 1 a 7. Los expertos en la técnica entenderán que la porción específica de una diana de un oligómero de captura (SEQ ID NOS 8-14), o su equivalente de ARN, puede estar enlazada a cualquier resto que le permita unirse a una sonda inmovilizada (por ejemplo, una secuencia de la cola diferente o un miembro de una pareja de unión, tal como biotina o avidina). Cualquier cadena principal puede ligar la secuencia de bases de un oligómero de captura. Algunas realizaciones usan enlaces 2'-O-metilo en la porción específica de una diana de un oligómero de captura y enlaces de ADN convencionales en la porción de la cola. Una secuencia de polinucleótidos de la cola puede ser cualquier secuencia complementaria a una secuencia de una sonda inmovilizada, y generalmente tiene una longitud de secuencia de aproximadamente 5 a 50 residuos, y es preferiblemente una secuencia sustancialmente homopolímera en un intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 residuos (por ejemplo, C<sub>10</sub> a C<sub>40</sub>) que es complementaria a una secuencia homopolímera inmovilizada (por ejemplo, G<sub>15</sub>).

Las secuencias cebadoras se unen específicamente a una secuencia diana del ARN de VHA o a una cadena complementaria y flanquean una secuencia diana que se amplifica, aunque las secuencias cebadoras pueden contener secuencias adicionales que no se unen a la diana o a su secuencia complementaria. Un cebador puede ser un cebador promotor e incluir una secuencia promotora en 5', tal como un promotor de la polimerasa de ARN de T7 (SEQ ID NO: 19). Las realizaciones de cebadores promotores incluyen las de SEQ ID NOS 20 a 49. Otras realizaciones de cebadores específicos de VHA pueden incluir secuencias auxiliares, tales como secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción (SEQ ID NOS 132 a 135). Los expertos en la técnica apreciarán que una secuencia específica de una diana de un cebador, con o sin un promotor o secuencia auxiliar adjunto, puede servir como cebador en una variedad de condiciones de amplificación *in vitro*. Los oligómeros de la amplificación se diseñaron para secuencias en las regiones diana del genoma de VHA (por ejemplo, alrededor de las posiciones de nucleótidos 200, 3700, 4700, 5700, 5800, 6000 y 7000). Los expertos en la técnica apreciarán que estos números se refieren a regiones diana de VHA que solo son aproximadas y que esos oligómeros pueden actuar en un ensayo para más de una región diana. Es decir, los oligómeros no se limitan funcionalmente por los números de regiones diana identificadas que se proporcionan como una referencia abreviada para agrupar las realizaciones preferidas de la invención. Los oligómeros de la amplificación se pueden sintetizar como secuencias de ADN, ARN, ADN o ARN complementario, o secuencias de ARN y ADN mezcladas, y pueden incluir uno o varios enlaces no convencionales con la cadena principal de ácido nucleico. Por ejemplo, un oligómero de la SEQ ID NO: 106 se sintetizó con bases de ARN y enlaces 2'-O-metilo en los residuos 1 a 4 y bases de ADN y enlaces convencionales en los otros residuos.

Para una primera región diana de VHA (alrededor de la posición 200), los oligómeros de la amplificación incluyen aquellos con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 23 a 26 nt que están contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 138, e incluyen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 140. Las realizaciones de tales oligómeros incluyen las de SEQ ID NO: 51 a SEQ ID NO: 57. Las realizaciones de cebadores promotores para esta región, con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 50 a 53 nt, son las que incluyen porciones específicas de una diana de SEQ ID NOS 21 a 27. Los oligómeros de la amplificación para esta región diana, también incluyen aquellos con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 19 a 25 nt contenidos en SEQ ID NO: 141, y que contienen al menos la secuencia de una cualquiera entre las SEQ ID NOS 142 a 146. Las realizaciones de los oligómeros de la amplificación para esta región diana incluyen las de SEQ ID NOS 15 a 18, 20 a 27, 50 a 57 y 80 a 85.

Para una segunda región diana de VHA (alrededor de la posición 3700), los oligómeros de la amplificación incluyen aquellos con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 21 a 27 nt, contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 60 o en SEQ ID NO: 86, e incluyen al menos SEQ ID NO: 156. Las realizaciones de cebadores promotores que incluyen tales porciones específicas de una diana para esta región y tienen un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 48 a 54 nt, incluyen las de SEQ ID NOS 29 a 32. Las realizaciones de oligómeros de la amplificación para esta región diana incluyen las de SEQ ID NOS 28 a 30, 58 a 60 y 86 a 88.

Para una tercera región diana de VHA (alrededor de la posición 4700), los oligómeros de la amplificación incluyen aquellos con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 24 a 30 nt que están contenidos en SEQ ID NO: 147 e incluyen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 148, o están contenidos en SEQ ID NO: 157 e incluyen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 158. Las realizaciones de oligómeros de la amplificación para esta región diana incluyen las de SEQ ID NOS 31, 32, 61, 62, 89, 90 y 91, de las cuales, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 son

realizaciones de cebadores promotores que incluyen una secuencia de promotor en 5' unida a la secuencia específica de una diana.

5 Para una cuarta región diana de VHA (alrededor de la posición 5700), los oligómeros de la amplificación incluyen aquellos con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 18 a 27 nt que están contenidos en la secuencia SEQ ID NO: 93 o SEQ ID NO: 95. Las realizaciones de tales oligómeros incluyen las que contienen al menos una cualquiera entre SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 159 y SEQ ID NO: 160. Las realizaciones de oligómeros de la amplificación para esta región diana incluyen las de SEQ ID NOs 33, 63 y 92 a 97, de las cuales SEQ ID NO: 33 es una realización de cebador promotor que incluye una secuencia promotora en 5' unida a la secuencia específica de una diana.

10 Para una quinta región diana de VHA (alrededor de la posición 5800), los oligómeros de la amplificación incluyen aquellos con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 19 a 31 nt que están contenidos en SEQ ID NO: 149 e incluyen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 150. Las realizaciones de cebadores promotores, con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 51 a 56 nt, que incluyen tales porciones específicas de una diana son las de SEQ ID NOs 34 a 40. Otras realizaciones de oligómeros de la amplificación para esta región diana, incluyen las de SEQ ID NOs 64 a 70, y 97.

15 Para una sexta región diana de VHA (alrededor de la posición 6000), los oligómeros de la amplificación incluyen los de aproximadamente 24 a 28 nt, contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 161 e incluyen la secuencia de SEQ ID NO: 162. Las realizaciones de oligómeros de la amplificación para esta región diana incluyen las de SEQ ID NOs 41, 42, 71, 72, 98, 99 y 101, de las cuales SEQ ID NOs 41 y 42 son realizaciones de cebadores promotores que incluyen una secuencia promotora en 5', unida a la secuencia específica de una diana.

20 Para una séptima región diana de VHA (alrededor de la posición 7000), los oligómeros de la amplificación incluyen aquellos con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 20 a 30 nt, contenidos en SEQ ID NO: 151 y que incluyen al menos una cualquiera entre las secuencias SEQ ID NO: 152 a SEQ ID NO: 155. Otras realizaciones de oligómeros de la amplificación para esta región diana están contenidas en SEQ ID NO: 163 e incluyen al menos la secuencia de SEQ ID NO: 164. Las realizaciones adicionales son oligómeros de la amplificación que están contenidos en SEQ ID NO: 165 e incluyen al menos una cualquiera entre las secuencias SEQ ID NOs 166 a 168. Las realizaciones de cebadores promotores, con un tamaño dentro de un intervalo desde aproximadamente 51 a 56 nt, que incluyen porciones específicas de una diana de VHA para esta región, son SEQ ID NOs 43 a 49. Otras realizaciones de oligómeros de la amplificación para esta región incluyen las de SEQ ID NOs 73 a 79 y 102 a 108.

30 Los oligómeros se diseñaron para hibridarse y detectar secuencias de VHA amplificadas, que incluyen las sondas de detección de SEQ ID Nos 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 122, 123, 124, y 126 a 130. Los expertos en la técnica apreciarán que una sonda de detección se elegirá para hibridarse con una secuencia contenida dentro de una secuencia amplificada que se determina por la combinación de oligómeros de la amplificación que se utilizan. Los oligómeros de la sonda de detección se pueden sintetizar como ADN, ARN o polímeros de ADN y ARN mezclados, y pueden incluir enlaces alternativos con la cadena principal, tales como enlaces 2'-O-metilo. Por ejemplo, los oligómeros de SEQ ID NOs 109, 111, 117, 119, 121, 122, 128 y 130 se sintetizaron con enlaces 2'-O-metilo, y los oligómeros de SEQ ID NOs 124 y 127 se sintetizaron como nucleótidos mezclados de ADN y ARN con enlaces 2'-O-metilo desde el segundo residuo hasta el residuo 3' terminal. Las realizaciones preferidas de las sondas de detección tienen un marcador quimioluminiscente fijado, preferentemente un compuesto de éster de acridinio (AE) (documentos de patente de EE.UU. n° 5.185.439, 5.639.604, 5.585.481 y 5.656.744), que en realizaciones preferidas está fijado a la sonda mediante un enlazador no nucleótido (véanse los documentos de patente de EE.UU. n° 5.585.481, 5.656.744 y 5.639.604, en particular desde la columna 10, línea 6 hasta columna 11, línea 3, y en el Ejemplo 8). Las realizaciones de los oligómeros de la sonda se marcaron empleando métodos conocidos, con un compuesto de AE entre los residuos 9 y 10 para SEQ ID NOs 119, 121 y 124, entre los residuos 10 y 11 para SEQ ID NOs 115, 117, 126, 127 y 128, entre los residuos 11 y 12 para SEQ ID NOs 109, 111, 123, 124 y 130, entre los residuos 12 y 13 para SEQ ID NOs 113, 122 y 129, y entre los residuos 13 y 14 para SEQ ID NO: 122. Los oligómeros de la sonda se sometieron a ensayo y se caracterizaron por la hibridación con secuencias de oligómeros complementarios, mediante el uso de métodos convencionales para la determinación de la T<sub>m</sub> y/o hidrólisis diferencial del éster de acridinio en un complejo de hibridación (descrito en detalle en el documento de patente de EE.UU. n° 5.283.174). Por ejemplo, las hibridaciones se realizaron mediante el uso de parejas complementarias de las secuencias SEQ ID NO: 109 y SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111 y SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113 y SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115 y SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117 y SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119 y SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 124 y SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 128 y SEQ ID NO: 100 y SEQ ID NO: 130 y SEQ ID NO: 131. Los ensayos de hibridación se pueden realizarse utilizando otras secuencias complementarias, tales como SEQ ID NO: 124 con SEQ ID NO: 137 y SEQ ID NO: 129 con SEQ ID NO: 136.

50 Las composiciones de la presente invención incluyen kits para la detección de secuencias de ácido nucleico de VHA. Dichos kits incluyen oligómeros de la amplificación tal y como se describen en la presente memoria que actúan como cebadores para amplificar las secuencias de ácido nucleico de VHA *in vitro*. Los kits a modo de ejemplo incluyen un primer oligómero de la amplificación que se hibrida específicamente con una secuencia en una región diana del genoma de ARN de VHA o su secuencia complementaria, y un segundo oligómero de la amplificación que se hibrida

específicamente con otra secuencia de VHA en la región diana, preferiblemente una complementaria a la secuencia de ARN genómico de VHA. Las realizaciones de los kits incluyen oligómeros de la amplificación que son combinaciones de cebadores y de cebadores promotores, tal y como se describen en la presente memoria. Los kits también pueden contener uno o varios oligómeros que sirven como sondas de detección para detectar secuencias de VHA amplificadas de la región diana de los cebadores seleccionados para el kit. Los kits de las realizaciones que incluyen los oligómeros de la sonda, utilizan una o varias de las secuencias de la sonda de detección, tal y como se describen en esta memoria, que pueden incluir un marcador fijado directa o indirectamente al oligómero de una sonda. Los kits también pueden contener oligómeros que sirven como oligómeros de captura para purificar un ARN diana de VHA, a partir de una muestra. Las realizaciones de tales oligómeros de captura, tal y como se describen en esta memoria pueden contener una secuencia de cola fijada covalentemente u otro resto que se une usado en la captura de una diana. Los kits útiles para poner en práctica los métodos descritos en esta memoria, también se incluyen en la invención, y las realizaciones preferidas incluyen por lo menos dos oligómeros de la amplificación, tal y como se describen en la presente memoria, y también pueden incluir reactivos para realizar la amplificación *in vitro*, por ejemplo, enzimas, soluciones salinas y compuestos sustrato para la síntesis de ácido nucleico. Los oligómeros descritos en esta memoria se pueden envasar en una variedad de realizaciones diferentes, y por lo tanto, los expertos en la técnica apreciarán que la invención abarca muchas configuraciones diferentes de kits. Por ejemplo, un kit puede incluir oligómeros de la amplificación para solo una región diana del genoma de VHA, o puede incluir oligómeros de la amplificación para múltiples regiones diana de VHA. Los expertos en la técnica apreciarán que un kit que incluye una sonda de detección, incluirá una sonda que se une a una secuencia amplificada por los oligómeros de la amplificación del kit. Esto es, la selección de los oligómeros de la amplificación y de los oligómeros de la sonda de detección para un kit, estará ligada por sus regiones diana deseadas.

Una realización del ensayo para detectar el ácido nucleico de VHA en una muestra, incluye las etapas de capturar el ácido nucleico diana de VHA procedente de una muestra, mediante el uso de un oligómero de captura, amplificar una región del ácido nucleico de VHA capturado mediante el uso de una combinación de al menos dos cebadores, y detectar la secuencia amplificada de VHA hibridándola específicamente con un oligómero de una sonda de detección y detectar una señal que se produce en la sonda unida a la secuencia de VHA amplificada. Las realizaciones preferidas utilizan una reacción de amplificación asociada a la transcripción o mediada por la transcripción. Se puede marcar el ácido nucleico amplificado o la sonda, o ambos pueden estar sin marcar y se produce una señal detectable a partir de un marcador indirecto o una respuesta asociada con el complejo de hibridación, tal como un impulso eléctrico resultante de la hibridación de la sonda y el ácido nucleico amplificado.

La etapa de captura utiliza preferiblemente un oligómero de captura que incluye una secuencia específica de una diana (por ejemplo, SEQ ID NOs 8 a 14) que se hibrida específicamente con una secuencia diana de VHA y un resto que permite que el ácido nucleico diana hibridado se separe de otros componentes de la muestra. La etapa de captura puede usar un oligómero de captura que también incluye una porción de cola, por ejemplo, como en SEQ ID NOs 1-7, que sirven como el resto que permite que el ácido nucleico diana se separe de otros componentes de la muestra mediante la hibridación de la porción de cola con una sonda inmovilizada, tal y como se ha descrito previamente (documento de patente de EE.UU. nº 6.110.678). Las realizaciones preferidas utilizan soportes que son esferas magnéticas que son monodispersas (es decir, de tamaño uniforme  $\pm$  aproximadamente el 5%) con oligómeros poli-dT fijados covalentemente o inmovilizados que se hibridan con una secuencia complementaria de la cola del oligómero de captura. El complejo de hibridación que incluye por lo menos el ácido nucleico diana y el oligómero de captura, y preferiblemente también incluye la sonda inmovilizada, se separa de otros componentes de la muestra, empleando métodos convencionales de separación física (por ejemplo, aplicación de una fuerza magnética, filtración o centrifugación) y el ácido nucleico diana capturado se puede lavar una o varias veces para purificar adicionalmente el ácido nucleico diana de otros componentes de la muestra. Por ejemplo, las partículas con el ácido nucleico diana fijado en un complejo de hibridación se suspenden una o varias veces en una solución de lavado que mantiene el complejo, y luego las partículas con el complejo fijado se recuperan desde la solución de lavado, tal y como se ha descrito anteriormente.

La amplificación de la secuencia diana de VHA capturada utiliza una reacción de amplificación *in vitro* que emplea al menos dos cebadores que flanquean la secuencia que se va a amplificar, por ejemplo, una secuencia de VHA flanqueada por SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 95, o sus secuencias complementarias. Una realización emplea una reacción de amplificación asociada a la transcripción que produce muchas copias de ARN de una secuencia, en condiciones sustancialmente isotérmicas (tal y como se ha descrito anteriormente en los documentos de patente de EE.UU. nº 5.399.491 y 5.554.516). La amplificación asociada a la transcripción utiliza dos tipos de cebadores (uno un cebador promotor que contiene una secuencia promotora para una polimerasa de ARN), enzimas (una transcriptasa inversa y una polimerasa de ARN), sustratos (trifosfatos de desoxirribonucleósido, trifosfatos de ribonucleósido) y sales y tampones apropiados en solución para producir múltiples transcritos de ARN a partir de un molde de ácido nucleico. En pocas palabras, un cebador promotor se hibrida específicamente con una secuencia de ARN diana y la transcriptasa inversa crea una primera hebra de ADNc por extensión desde el extremo 3' del cebador promotor y degrada la hebra molde en el dúplex de ADN:ARN resultante, empleando actividad RNasa H. Un segundo cebador se une al ADNc y se sintetiza otra hebra de ADN con la transcriptasa inversa desde el extremo del segundo cebador, para crear un ADN bicatenario con una secuencia promotora funcional a la que se une la polimerasa de ARN. Múltiples transcritos de ARN ("amplicones") se transcriben y cada uno puede ser un molde en

una nueva ronda de replicación, tal y como se ha descrito anteriormente, generando de este modo grandes cantidades de la secuencia amplificada monocatenaria (por ejemplo, aproximadamente 100 a 3.000 transcritos a partir de un solo molde). Las realizaciones que utilizan una reacción de amplificación asociada a la transcripción pueden utilizar cebadores promotores (SEQ ID NOs 20 a 49) con otros cebadores (SEQ ID NOs 15 a 18, 80 a 99 y 101 a 108) para amplificar secuencias de VHA seleccionadas para la detección.

La etapa de detección emplea al menos una sonda que se une específicamente a las secuencias de VHA amplificadas. Las realizaciones pueden usar cualquier método de detección conocido (por ejemplo, la detección de una señal radiactiva, fluorescente, enzimática, colorimétrica, eléctrica o luminiscente) para detectar la unión de la sonda de detección con las secuencias de VHA amplificadas, y la señal detectada indica la presencia de VHA en la muestra. Las realizaciones de los oligómeros de la sonda (SEQ ID NOs 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 122 a 124, 126 a 130) pueden estar sin marcar o marcadas, utilizando cualquiera entre una variedad de marcadores conocidos. En realizaciones preferidas, la etapa de detección se lleva a cabo en una reacción de detección homogénea sin retirar de la mezcla la sonda de detección no unida. Las realizaciones de los oligómeros de la sonda para uso en reacciones de detección homogéneas están marcadas preferiblemente con una entre una variedad de compuestos de AE que producen una señal quimioluminiscente que se detecta tal y como se ha descrito en detalle previamente (documentos de patente de EE.UU. nº 5.283.174, 5.656.744 y 5.658.737).

Una realización preferida del ensayo incluye generalmente las etapas siguientes. Se proporciona una muestra que contiene VHA, que se puede preparar mediante el uso de métodos convencionales de laboratorio para preparar una solución sustancialmente acuosa o una suspensión que contiene VHA. Una parte alícuota (0,5 ml) de la solución o de la suspensión de la muestra se mezcla con aproximadamente un volumen igual (0,4 a 0,5 ml) de un reactivo de captura de una diana, es decir, una solución que contiene uno o varios oligómeros de captura (4 pmol/reacción), partículas magnéticas con sondas inmovilizadas fijadas, complementarias a una porción de los oligómeros de captura, y compuestos salinos para proporcionar una condición de hibridación. El reactivo de captura de una diana incluye preferiblemente un detergente u otro agente caotrópico que rompe las partículas de VHA y libera el ARN de VHA para hibridarse con los oligómeros de captura. La mezcla se incuba 20-30 min a 60°C para permitir la hibridación de la porción específica de una diana del oligómero de captura, con la secuencia diana de VHA, y luego a temperatura ambiente durante 20-30 min para permitir la unión del oligómero de captura y la sonda inmovilizada. Se aplica un campo magnético a la parte exterior del recipiente de la reacción durante aproximadamente 10 min, para separar las partículas con los complejos de hibridación fijados que incluyen ARN de VHA, y la fase de solución que contiene otros componentes de la muestra, se elimina por aspiración. Para lavar las partículas con los complejos de hibridación fijados, se suspenden en 1 ml de tampón de lavado, se separan de la solución sustancialmente tal y como se ha descrito anteriormente, y se retira la solución. Las partículas con complejos de hibridación fijados que incluyen el ARN de VHA purificado, se mezclan con una solución que contiene reactivos de la amplificación (tampones, sales, dXTP y sustratos de XTP), y una combinación de oligómeros de la amplificación (un cebador promotor y una combinación de cebadores, cada uno con 3 a 30 pmol, generalmente 15 pmol cada uno), y se cubren con aceite (0,2 ml de aceite de silicona filtrado) para evitar la evaporación, y se incuban durante 10 min a 60°C, a continuación durante 10 min a 42°C, y después se añaden las enzimas (transcriptasa inversa y polimerasa de ARN), y la mezcla se incuba durante 60 min a 42°C. Para la detección, la mezcla de la reacción de amplificación se incuba con al menos un oligómero de una sonda de detección marcada con acridinio, para proporcionar una señal máxima detectable (unidades relativas de luz o URL) de 2 millones o menos, tal como se detectó mediante el uso de métodos convencionales en un luminómetro (por ejemplo, Gen-Probe Leader<sup>®</sup>, Gen-Probe Incorporated, San Diego, CA). La sonda de detección se mezcla con una parte alícuota diluida o sin diluir de la mezcla de la reacción de amplificación, en una solución de hibridación, se incuba durante 20 min a 60°C para permitir la hibridación del oligómero de una sonda con la secuencia diana amplificada. A continuación, el marcador sobre las sondas no unidas se hidroliza empleando un reactivo de selección (por ejemplo, una base) y se incuba durante 10 min a 60°C, seguido por la adición de un reactivo de detección (por ejemplo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para producir quimioluminiscencia, seguido de la neutralización del pH (por ejemplo, mediante la adición de ácido), y la detección de la señal quimioluminiscente (URL) en un luminómetro (por ejemplo, 1-5 segundos).

Para el uso en los métodos descritos anteriormente, los oligómeros de captura, los oligómeros de amplificación y las sondas de detección se pueden sintetizar usando métodos convencionales para producir ADN, ARN o polímeros de ADN y ARN mezclados. Tales oligómeros pueden incluir enlaces convencionales o modificados y/o nucleósidos de origen natural (A, T o U, G, C), análogos (por ejemplo, inosina) o derivados sintéticos de purina y pirimidina (por ejemplo, bases P o K) (Lin & Brown, 1989, *Nucl. Acids Res.* 17:10373-83; Lin & Brown, 1992, *Nucl. Acids Res.* 20: 5149-52).

Los principios generales de la presente invención se pueden apreciar más a fondo haciendo referencia a los ejemplos siguientes, en donde se describen algunas realizaciones de la presente invención. Además de los componentes específicos descritos en los ejemplos, en general, los siguientes reactivos se utilizaron en los experimentos descritos a continuación. El reactivo de captura de una diana estaba constituido por HEPES 790 mM, LiOH 680 mM, 10% (v/v) de lauril sulfato de litio (LLS), ácido succínico 230 mM, 0,03% (v/v) de agente antiespumante, 100 µg/ml de partículas magnéticas (1 micra de partículas SERA-MAG<sup>®</sup>, Seradyn, Inc. Indianapolis, Ind.) con poli-dT<sub>14</sub> fijado covalentemente y uno o varios oligómeros de captura, cada uno con 4 pmol por 400 µl. El

tampón de lavado estaba constituido por NaCl 150 mM, HEPES 10 mM, NaOH 6,5 mM, EDTA 1 mM, 0,3% (v/v) de etanol, 0,1% de SDS, 0,02% (p/v) de metil parabeno, 0,01% (p/v) de propil parabeno, a pH 7,5. El reactivo de amplificación estaba constituido por Tris base 11,6 mM, Tris-HCl 15 mM, MgCl<sub>2</sub> 22,7 mM, KCl 23,3 mM, 3,33% de glicerol, acetato de Zn 0,05 mM, dATP 0,665 mM, dCTP 0,665 mM, dGTP 0,665 mM, dTTP 0,665 mM, ATP 5,32 mM, CTP 5,32 mM, GTP 5,32 mM y UTP 5,32 mM, a pH 7. El reactivo de la enzima estaba constituido por 140 U/μl de polimerasa de ARN de T7, 224 RTU/μl de transcriptasa inversa del virus de la leucemia de múrdo de Moloney (MMLV-RT), HEPES 16 mM, N-acetil-L-cisteína 70 mM, EDTA 3 mM, 0,05% (p/v) de azida sódica, Tris 20 mM, KCl 50 mM, 20% (v/v) de glicerol, 10% (v/v) de Triton<sup>®</sup> X-102, trehalosa 150 mM, a pH 7. (Las unidades enzimáticas son típicamente 1 U de polimerasa de ARN de T7 incorpora 1 nmol de ATP en el ARN en 1 h a 37°C, utilizando un molde de ADN que contiene un promotor de T7, y 1 U de MMLV-RT incorpora 1 nmol de dTTP en 10 min a 37°C, usando cebador oligo-dT 200-400 μM y molde de poli-A). El reactivo de la sonda estaba constituido por ácido succínico 100 mM, 2% (p/v) de LLS, LiOH 230 mM, alditriol-2 15 mM, LiCl 1,2 M, EDTA 20 mM, EGTA 20 mM, 3% (v/v) de etanol, ajustado a pH 4,7 con LiOH. El reactivo de la selección estaba constituido por ácido bórico 600 mM, NaOH 182 mM, 1% (v/v) de octoxinol (TRITON<sup>®</sup> X-100), a pH 8,5. Los reactivos de detección eran el reactivo de detección I, que contenía ácido nítrico 1 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 32 nM, y el reactivo de detección II (para neutralizar el pH) que era NaOH 1,5 M (véase el documento de patente de EE.UU. n° 5.283.174 para más detalles).

### Ejemplo 1: Caracterización de la sonda de detección

Los oligómeros de SEQ ID NOs 109, 111, 113, 119, 123, 126 y 130 se sintetizaron usando química de fosforamidita convencional (Caruthers y col., 1987, *Methods in Enzymol*, 154:287) y un marcador de éster de acridinio (AE) se fijó a través de un enlazador mediante el uso de métodos bien conocidos (documentos de patente de EE.UU. n° 5.185.439 y 5.283.174), y las sondas se purificaron utilizando métodos cromatográficos de rutina (por ejemplo, HPLC). Las sondas se marcaron con AE entre los residuos 11 y 12 de SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 123 y SEQ ID NO: 130, entre los residuos 12 y 13 de SEQ ID NO: 113, entre los residuos 10 y 11 de SEQ ID NO: 126, y entre los residuos 9 y 10 de SEQ ID NO: 119. Para la caracterización de los oligómeros de la sonda, cada uno se hibridó con un oligómero complementario de ADN y/o ARN (por ejemplo, SEQ ID NO: 109 con SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111 con SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113 con SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 119 con SEQ ID NO: 120 y SEQ ID NO: 130 con SEQ ID NO: 131), a temperaturas inferiores a la T<sub>m</sub> prevista de la sonda, y a continuación, la T<sub>m</sub> se determinó experimentalmente empleando métodos convencionales. La hidrólisis diferencial del marcador AE en las sondas hibridadas con un oligómero complementario, en comparación con AE en la sonda no unida, también se determinó experimentalmente mediante el uso de métodos convencionales (véase el documento de patente de EE.UU. n° 5.283.174). En pocas palabras, se determinó la relación entre el tiempo necesario para perder la mitad de la señal debido a la hidrólisis de AE en el híbrido, en comparación con el tiempo requerido para la hidrólisis de la mitad del marcador en la sonda no unida. Las T<sub>m</sub> estaban en el intervalo de 59°C a 66°C para los oligómeros de SEQ ID NOs 109, 111, 113, 119 y 130 cuando se hibridaban con un ADN complementario, y las T<sub>m</sub> estaban en el intervalo de 76°C a 81°C para los oligómeros de SEQ ID NOs 109, 111, 123, 126 y 130, cuando se hibridaban con un ARN complementario. Las relaciones de la hidrólisis diferencial estaban en el intervalo de 12 a 25 para las sondas de SEQ ID NOs 109, 111, 113, 119 y 130 cuando se hibridaban con un ADN complementario, y las relaciones de la hidrólisis diferencial estaban en el intervalo de 18 a 104 para las sondas de SEQ ID NOs 109, 111, 123, 126 y 130 cuando se hibridaban con un ARN complementario. Por otra parte, se realizaron ensayos similares de hibridación e hidrólisis diferencial para las sondas de SEQ ID NO: 121 marcadas entre los residuos 9 y 10, SEQ ID NO: 122 marcadas entre los residuos 13 y 14, SEQ ID NO: 124 marcadas entre los residuos 9 y 10 y SEQ ID NO: 130 marcadas entre los residuos 11 y 12, y las relaciones de la hidrólisis diferencial estaban en el intervalo de 43 a 190 cuando las sondas se hibridaron con un ARN complementario. Estos resultados mostraron que todos estos oligómeros sintéticos de la sonda se hibridaban específicamente con sus secuencias diana complementarias y producían señales detectables, útiles para detectar específicamente las secuencias amplificadas de VHA.

### Ejemplo 2: Purificación del ARN de VHA a partir de muestras

Los oligómeros de captura de SEQ ID NOs 1 a 7, sintetizados usando química de fosforamidita convencional y purificados usando métodos convencionales, se sometieron a ensayo para estudiar su capacidad de capturar el ARN de VHA liberado desde el virus en muestras de plasma humano. Las muestras se prepararon añadiendo partículas de VHA con concentraciones conocidas, a plasma humano normal (0,5 ml) y las muestras que contenían VHA (por ejemplo, de 500 a 1000 por reacción) se mezclaron con un volumen igual de reactivo de captura de una diana que contenía cada oligómero de captura de forma individual (4 pmol/reacción) y partículas magnéticas de polidT. Las mezclas se incubaron durante 30 min a 60°C, y después durante 30 min a temperatura ambiente para formar los complejos de hibridación que capturaban el ARN de VHA en las partículas. Las partículas magnéticas con ARN de VHA capturado y fijado, se separaron mediante la aplicación de un campo magnético durante 10 min a la parte exterior del recipiente, a continuación, la fase de solución se retiró por aspiración para eliminar otros componentes de la muestra, y las partículas con complejos de hibridación fijados, se lavaron dos veces secuencialmente, usando cada vez 1 ml del tampón de lavado a temperatura ambiente y retirando la solución de lavado de las partículas por aspiración. Las partículas con complejos de hibridación fijados, se suspendieron después en el reactivo de la sonda (0,1 ml) que contenía una sonda de detección marcada, tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1, y se incubaron

durante 20 min a 60°C, seguido de la adición del reactivo de selección (0,2 ml), mezclando e incubando durante 10 min a 60°C. La producción y la detección de la señal quimioluminiscente se realizó añadiendo 200 µl de reactivo de detección I, incubando y neutralizando el pH de la mezcla mediante la adición de 200 µl de reactivo de detección II, y midiendo la URL empleando un luminómetro, sustancialmente tal y como se ha descrito anteriormente. Para todos los oligómeros de captura sometidos a ensayo, la presencia del ARN de VHA en la muestra se detectó mediante la detección de una señal positiva significativamente más elevada que el ruido de fondo (URL para una muestra similar que no contenía VHA). Los ensayos mostraron pequeñas diferencias significativas del rendimiento entre los oligómeros de captura.

**Ejemplo 3: Amplificación y detección de secuencias de VHA**

Las muestras de VHA en plasma humano normal se prepararon sustancialmente tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2 y el ARN de VHA fue capturado mediante el uso de diversas combinaciones de oligómeros de captura para los ensayos, para amplificar y detectar regiones diana seleccionadas del genoma de VHA. Para una región diana de los residuos 0-305 del genoma, se utilizaron SEQ ID NOs 2, 3 y 4 en la etapa de captura. Para una región diana en los residuos 4714-4765 del genoma, se utilizaron SEQ ID NOS 4, 5, 6 y 7 en la etapa de captura. Para una región diana en los residuos 5495-5788 del genoma, se utilizaron SEQ ID NOS 1 y 6 en la etapa de captura. Para una región diana en los residuos 5788-6069 del genoma, se utilizó SEQ ID NO: 2 en la etapa de captura. Para una región diana en los residuos 6952-7413 del genoma, se utilizaron SEQ ID NOS 1, 4, 5 y 7 en la etapa de captura. Las etapas de captura se realizaron sustancialmente tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2.

El ARN de VHA capturado se amplificó en reacciones sustancialmente tal y como se han descrito anteriormente, que contenían combinaciones diferentes de oligómeros de la amplificación para servir como cebadores para diferentes regiones diana en el genoma de VHA. Los cebadores utilizados para amplificar las regiones diana fueron los siguientes: SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 22 para la región de los residuos 0-305, SEQ ID NO: 89 y SEQ ID NO: 32 para la región de los residuos 4714-4765, SEQ ID NO: 92 y SEQ ID NO: 33 para la región de los residuos 5495-5788, SEQ ID NO: 94 y SEQ ID NO: 37 para la región de los residuos de 5788-6069, y SEQ ID NO: 108 y SEQ ID NO: 46 para la región de los residuos 6952-7413. Las reacciones de amplificación se realizaron todas sustancialmente igual que como se ha descrito anteriormente. Es decir, partículas con el ARN de VHA fijado, procedentes de la etapa de captura de una diana, se mezclaron con el reactivo de la amplificación y la combinación individual de oligómeros de la amplificación descritos anteriormente (generalmente 15 pmol de cada uno), y se cubrieron con aceite de silicona (0,2 ml) para evitar la evaporación, y se incubaron durante 10 min a 60°C y luego durante 10 min a 42°C. El reactivo de la enzima se añadió (transcriptasa inversa y polimerasa de ARN), y las reacciones de amplificación se incubaron durante 60 min a 42°C.

Para la detección, la mezcla de amplificación se incubó con un oligómero de una sonda de detección marcado que se hibrida específicamente con secuencias contenidas en la región amplificada. Estas incluían SEQ ID NO: 109 o SEQ ID NO: 111 para la región de residuos 0-305, SEQ ID NO: 115 para la región de residuos 4714-4765, SEQ ID NO: 117 para la región de residuos 5495-5788, SEQ ID NO: 121 y/o SEQ ID NO: 122 para la región de residuos 5788-6069, y SEQ ID NO: 129 o SEQ ID NO: 130 para la región de residuos 6952-7413. Las sondas se proporcionan en el reactivo de la sonda en una cantidad previamente determinada, basándose en la actividad específica de la sonda marcada para producir una señal detectable máxima de 2 millones de URL o menos desde la sonda hibridada marcada. Las sondas y las secuencias amplificadas se incubaron en el reactivo de la sonda a 55-60°C, y la señal quimioluminiscente se produjo a partir de las sondas hibridadas y se detectó sustancialmente tal y como se ha descrito en los Ejemplos 1 y 2. Para todas las combinaciones de cebadores sometidas a ensayo con el ARN capturado de VHA, la sensibilidad del ensayo de amplificación detectaba entre 400 y 1000 copias de ARN de VHA presentes en las muestras.

Las combinaciones de oligómeros de captura, oligómeros de amplificación y sondas de detección utilizadas para estos ensayos, se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Combinaciones de oligómeros para ensayos de VHA en muestras

Región diana (Residuos)	Oligómero(s) de captura	Oligómeros de amplificación	Sonda(s) de detección
0-305	SEQ ID NOs 2, 3 y 4	SEQ ID NOs 16 y 22	SEQ ID NO 109 o 111
4714-4765	SEQ ID NOs 4, 5, 6 y 7	SEQ ID NOs 32 y 89	SEQ ID NO 115
5495-5788	SEQ ID NOs 1 y 6	SEQ ID NOs 33 y 92	SEQ ID NO 117
5788-6069	SEQ ID NO 2	SEQ ID NOs 37 y 94	SEQ ID NOs 121 y/o 122
6952-7413	SEQ ID NOs 1, 4, 5 y 7	SEQ ID NOs 46 y 108	SEQ ID NO 129 o 130

Se realizaron experimentos similares utilizando los oligómeros de captura diferentes (SEQ ID NOs 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) por separado con muestras que contenían VHA, en las que la etapa de captura de una diana se realizó sustancialmente tal y como se ha descrito anteriormente, en nueve réplicas para cada condición del ensayo. Para todos estos ensayos, la región diana eran los residuos 5788 a 6069 de VHA, para los que se utilizaron los mismos

oligómeros de amplificación SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 96 en las reacciones de amplificación con el ARN capturado de VHA, tal y como se ha descrito anteriormente, y los productos amplificados se detectaron midiendo la quimioluminiscencia procedente de la sonda de detección hibridada (SEQ ID NO: 123 o 124, marcada con AE entre los residuos 11 y 12), tal y como se ha descrito anteriormente. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla 2 (URL promedio para nueve réplicas).

Tabla 2: Amplificación y detección de la región diana en los residuos 5788-6069

Purificación mediante oligómero de captura	Señal detectada (URL media)
SEQ ID NO: 1	292.136
SEQ ID NO: 2	275.732
SEQ ID NO: 3	478.463
SEQ ID NO: 4	522.837
SEQ ID NO: 5	443.830
SEQ ID NO: 6	416.905
SEQ ID NO: 7	369.337

Estos resultados muestran que todos los oligómeros de captura capturaban ARN de VHA suficientemente purificado a partir de muestras que se iban a amplificar y detectar, para indicar la presencia de VHA en las muestras.

#### Ejemplo 4: Detección de VHA en muestras de plasma

En este ejemplo se usa un ensayo que detectaba el ácido nucleico de VHA en muestras de plasma positivas para VHA. Para preparar las muestras, una partida comercialmente disponible de VHA en plasma humano se diluyó en plasma negativo para VHA, para obtener muestras con 25, 30, 100, 300 y 500 copias de VHA/ml; un testigo negativo era plasma sin VHA. Para cada ensayo, realizado sobre muestras de 20 replicados, se mezclaron muestras de 0,5 ml con 0,4 ml del reactivo de captura de una diana que contenía oligómeros de captura de SEQ ID NO: 4 (6,5 pmol/reacción) y SEQ ID NO: 5 (1,3 pmol/reacción) y la etapa de captura de una diana se llevó a cabo sustancialmente tal y como se ha descrito en el Ejemplo 3, excepto que se incubó durante 20 min a 60°C. Para cada ensayo, partículas magnéticas lavadas con los complejos de hibridación fijados que incluían oligómeros de captura de SEQ ID NOs 4 y 5 unidos al ARN de VHA, se emplearon en las reacciones de amplificación que contenían 75 µl de reactivo de amplificación que contenía oligómeros de amplificación (SEQ ID NO: 36, con 13 pmol/reacción y SEQ ID NO: 96 con 20 pmol/reacción). Tal y como se ha descrito anteriormente, cada mezcla se cubrió con una capa de aceite, se incubó 10 min a 60°C, después se añadió el reactivo de la enzima (25 µl), y la mezcla se incubó durante 60 min a 41,5°C para permitir la amplificación de la secuencia diana de VHA. Las secuencias amplificadas se detectaron mediante el uso de sondas de detección marcadas con 2-metil-AE (SEQ ID NOs 121 y 122, cada una con 0,007-0,13 pmol/reacción en 25 µl de reactivo de una sonda), las cuales se incubaron durante 15 min a 60°C para la hibridación de las sondas con las secuencias amplificadas de VHA. A continuación, se añadieron 250 µl de reactivo de selección y la mezcla se incubó 10 min a 60°C para hidrolizar el marcador en las sondas no unidas, y la detección se realizó como se ha descrito anteriormente utilizando los reactivos de detección I y II para producir la señal quimioluminiscente (URL) medida en un luminómetro (LEADER<sup>®</sup> HC Plus, Gen-Probe Inc.). Los resultados mostraron que el ensayo tiene una sensibilidad de aproximadamente 80% a 100% para muestras que contienen 25 copias de VHA por ml, aproximadamente 90% a 100% para muestras que contienen 30 copias de VHA por ml, aproximadamente 98% a 100% para muestras que contienen 100 copias de VHA por ml, y 100% para muestras que contienen 300 y 500 copias de VHA por ml. No se detectaron resultados positivos para los testigos negativos (que no contenían VHA). Estos resultados muestran que el ensayo detecta VHA en muestras clínicas con una sensibilidad de aproximadamente 25 copias de VHA por ml de muestra.

#### Ejemplo 5: Detección de ARN de VHA y otra diana vírica en la misma muestra

Este ensayo incluye las etapas de captura de una diana, amplificación y detección, sustancialmente tal y como se han descrito en los Ejemplos 1 a 4 para detectar VHA e utiliza oligómeros adicionales para capturar, amplificar y detectar otra diana, parvovirus humano B19, en la misma muestra. Para detectar el VHA, los oligómeros de captura son SEQ ID NOs 4 y 5, los oligómeros de amplificación son SEQ ID NOs 36 y 96 y las sondas de detección son SEQ ID NOs 121 y 122, utilizados sustancialmente tal y como se ha descrito en el Ejemplo 4. Para detectar el ácido nucleico del parvovirus B19, se emplea una sonda de captura de SEQ ID NO: 169, oligómeros de amplificación de SEQ ID NOs 170 y 171 y sondas de detección de SEQ ID NO: 173 marcadas entre los residuos 5 y 6 y SEQ ID NO: 174 marcadas entre los residuos 9 y 10, de forma similar a un ensayo descrito previamente para detectar parvovirus B19 (documento de patente de EE.UU. n° US-2003-0124578-A1). Las muestras de 0,5 ml de plasma humano normal se preparan para contener cantidades conocidas de VHA y parvovirus B19, y luego se mezclan con 0,4 ml de reactivo de captura de una diana que contiene los oligómeros de captura SEQ ID NOs 4, 5 y 169). Las etapas de captura de una diana se realizan sustancialmente tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2 y las dianas víricas purificadas se amplifican en la misma mezcla de reacción de amplificación, sustancialmente tal y como se ha

5 descrito en los Ejemplos 3 y 4, pero utilizando los oligómeros de amplificación específicos de VHA y específicos de  
parvovirus, descritos anteriormente. Después de la amplificación de las secuencias diana víricas, la etapa de  
detección utiliza sondas específicas de VHA y sondas específicas de parvovirus, tal y como las descritas  
anteriormente, pero las sondas para las diferentes dianas víricas se marcan con diferentes compuestos de éster de  
10 acridinio, para permitir la detección de diferentes señales en la etapa de detección mediante el uso de cinéticas  
diferenciales (tal y como se describe en el documento de patente de EE.UU. nº 5.658.737). En estos ensayos, tanto  
los ácidos nucleicos de VHA y de parvovirus B19 se detectan en las muestras que contienen ambas dianas. La  
sensibilidad del ensayo para la detección de VHA es de aproximadamente 25 copias/ml, es decir, las señales  
positivas se detectan en el 80% a 100% de las muestras que contienen 25, 30, 100, 300 y 500 copias/ml de VHA. La  
15 sensibilidad del ensayo para la detección de parvovirus B19 en la muestra es tan baja como 150 unidades  
internacionales/ml (UI/ml), es decir, las señales positivas se detectan en el 20% a 40% de las muestras que  
contienen 150 UI/ml. El ensayo detecta de manera fiable 400 o más UI de parvovirus B19 /ml, es decir, 70% a 100%  
de detección positiva para muestras que contienen 400, 600, 800, 1600 y 3000 UI/ml. Estos resultados muestran  
que el ácido nucleico de VHA se detecta específicamente cuando la muestra incluye VHA y otro virus, parvovirus  
humano B19, que también se detecta específicamente.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Gen-Probe Incorporated  
 <120> Composiciones y métodos para la detección de ácido nucleico del virus de la hepatitis A  
 <130> GP135-PCT  
 10 <140> Se asignará  
 <141> 13-07-2005  
 <150> US 60/587,734  
 15 <151> 13-07-2004  
 <160> 174  
 <170> PatentIn versión 3.1  
 20 <210> 1  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> oligómero sintético, sonda de captura  
 <400> 1  
 30 ggacuuccaa gaggggcucc gtttaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 54  
 <210> 2  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, sonda de captura  
 40 <400> 2  
 uuuagacucc uacagcucca ugcuaauttt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60  
 <210> 3  
 <211> 61  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, sonda de captura  
 50 <400> 3  
 uucauuucug uccaauucuc aucauucatt taaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60  
 a 61  
 <210> 4  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 60 <223> oligómero sintético, sonda de captura  
 <400> 4  
 gaaauugaau aguaaguucc accucttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 58

# ES 2 392 445 T3

5	<210> 5 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligómero sintético, sonda de captura	
10	<400> 5 gc <u>auagc</u> gc aggaaaa <u>uu</u> a u <u>cau</u> gg <u>ttt</u> aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
	<210> 6 <211> 56 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligómero sintético, sonda de captura	
20	<400> 6 gc <u>auagc</u> gc aggaaaa <u>uu</u> a au <u>ctt</u> taaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa	56
	<210> 7 <211> 58 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligómero sintético, sonda de captura	
30	<400> 7 ga <u>caaa</u> agaa a <u>ac</u> uggagac uu <u>uc</u> tttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	58
	<210> 8 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligómero sintético	
45	<400> 8 ggact <u>t</u> caa gaggggctcc g	21
	<210> 9 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligómero sintético	
55	<400> 9 tttagactcc tacagctcca tgctaat	27
	<210> 10 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligómero sintético	

# ES 2 392 445 T3

	<400> 10 ttcatttctg tccatttctc atcattca	28
5	<210> 11 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligómero sintético	
	<400> 11 gaaattgaat agtaagtcc acctc	25
15	<210> 12 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> oligómero sintético	
25	<400> 12 gcatagctgc aggaaaatta atcatgg	27
30	<210> 13 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> oligómero sintético	
	<400> 13 gcatagctgc aggaaaatta atc	23
40	<210> 14 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> oligómero sintético	
	<400> 14 gacaaaagaa aactggagac ttcc	25
50	<210> 15 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> oligómero sintético	
	<400> 15 ccatggtgag gggacttgat acc	23
60	<210> 16 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> oligómero sintético	

	<400> 16 cttgatacct caccgccgtt tg	22	
5	<210> 17 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
10	<220> <223> oligómero sintético		
15	<400> 17 ttgatacctc accgccgttt gcc	23	
20	<210> 18 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
25	<220> <223> oligómero sintético		
30	<400> 18 gatacctcac cgccgtttgc ctagg	25	
35	<210> 19 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
40	<220> <223> promotor del bacteriófago T7		
45	<400> 19 aatthaatac gactcactat agggaga	27	
50	<210> 20 <211> 49 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
55	<220> <223> oligómero sintético, cebador del promotor		
60	<220> <221> promotor <222> (1)..(27) <223>		
65	<400> 20 aatthaatac gactcactat agggagaaga gaaacagatt aaagaacctt	49	
70	<210> 21 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
75	<220> <223> oligómero sintético, cebador del promotor		
80	<220> <221> promotor <222> (1)..(27) <223>		

# ES 2 392 445 T3

	<code>&lt;400&gt; 21</code> aatttaatac gactcactat agggagagga agaaagaaga cagaaagcgt gaa	53
5	<code>&lt;210&gt; 22</code> <code>&lt;211&gt; 51</code> <code>&lt;212&gt; ADN</code> <code>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</code>	
10	<code>&lt;220&gt;</code> <code>&lt;223&gt; oligómero sintético, cebador del promotor</code>	
15	<code>&lt;220&gt;</code> <code>&lt;221&gt; promotor</code> <code>&lt;222&gt; (1)..(27)</code> <code>&lt;223&gt;</code>	
20	<code>&lt;400&gt; 22</code> aatttaatac gactcactat agggagagga agaaagaaga cagaaagcgt g	51
25	<code>&lt;210&gt; 23</code> <code>&lt;211&gt; 50</code> <code>&lt;212&gt; ADN</code> <code>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</code>	
30	<code>&lt;220&gt;</code> <code>&lt;223&gt; oligómero sintético, cebador del promotor</code>	
35	<code>&lt;220&gt;</code> <code>&lt;221&gt; promotor</code> <code>&lt;222&gt; (1)..(27)</code> <code>&lt;223&gt;</code>	
40	<code>&lt;400&gt; 23</code> aatttaatac gactcactat agggagagaa gaaagaagac agaaagcgtg	50
45	<code>&lt;210&gt; 24</code> <code>&lt;211&gt; 52</code> <code>&lt;212&gt; ADN</code> <code>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</code>	
50	<code>&lt;220&gt;</code> <code>&lt;223&gt; oligómero sintético, cebador del promotor</code>	
55	<code>&lt;220&gt;</code> <code>&lt;221&gt; promotor</code> <code>&lt;222&gt; (1)..(27)</code> <code>&lt;223&gt;</code>	
60	<code>&lt;400&gt; 24</code> aatttaatac gactcactat agggagatgg aagaagaag acagaaagcg tg	52
65	<code>&lt;210&gt; 25</code> <code>&lt;211&gt; 51</code> <code>&lt;212&gt; ADN</code> <code>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</code>	
70	<code>&lt;220&gt;</code> <code>&lt;223&gt; oligómero sintético, cebador del promotor</code>	
75	<code>&lt;220&gt;</code> <code>&lt;221&gt; promotor</code> <code>&lt;222&gt; (1)..(27)</code> <code>&lt;223&gt;</code>	

# ES 2 392 445 T3

	<400> 25 aatttaatac gactcactat agggagatgg aagaaagaag acagaaagcg t	51
5	<210> 26 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligómero sintético, cebador del promotor	
15	<220> <221> promotor <222> (1)..(27) <223>	
	<400> 26 aatttaatac gactcactat agggagactg gaagaaagaa gacagaaagc g	51
20	<210> 27 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> oligómero sintético, cebador del promotor	
30	<220> <221> promotor <222> (1)..(27) <223>	
35	<400> 27 aatttaatac gactcactat agggagagca aggggagagc cctggaagaa ag	52
40	<210> 28 <211> 54 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <221> promotor <222> (1)..(27) <223>	
50	<400> 28 aatttaatac gactcactat agggagacag tattataat ttcaacagtc acag	54
55	<210> 29 <211> 48 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> oligómero sintético, cebador del promotor	
60	<220> <221> promotor <222> (1)..(27) <223>	

# ES 2 392 445 T3

	<code>&lt;400&gt; 29 aatttaatac gactcactat agggagatct caacaaacca attatgtg</code>	48
5	<code>&lt;210&gt; 30 &lt;211&gt; 54 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Secuencia Artificial</code>	
10	<code>&lt;220&gt; &lt;223&gt; oligómero sintético, cebador del promotor</code>	
15	<code>&lt;220&gt; &lt;221&gt; promotor &lt;222&gt; (1)..(27) &lt;223&gt;</code>	
	<code>&lt;400&gt; 30 aatttaatac gactcactat agggagacat gactctcaac aaaccaatta tgtg</code>	54
20	<code>&lt;210&gt; 31 &lt;211&gt; 51 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Secuencia Artificial</code>	
25	<code>&lt;220&gt; &lt;223&gt; oligómero sintético, cebador del promotor</code>	
30	<code>&lt;220&gt; &lt;221&gt; promotor &lt;222&gt; (1)..(27) &lt;223&gt;</code>	
35	<code>&lt;400&gt; 31 aatttaatac gactcactat agggagacaa tgcttcctt aacataaact g</code>	51
40	<code>&lt;210&gt; 32 &lt;211&gt; 53 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Secuencia Artificial</code>	
45	<code>&lt;220&gt; &lt;223&gt; oligómero sintético, cebador del promotor</code>	
50	<code>&lt;220&gt; &lt;221&gt; promotor &lt;222&gt; (1)..(27) &lt;223&gt;</code>	
55	<code>&lt;400&gt; 32 aatttaatac gactcactat agggagacga tcaattgctt ccttaacata aac</code>	53
60	<code>&lt;210&gt; 33 &lt;211&gt; 47 &lt;212&gt; ADN &lt;213&gt; Secuencia Artificial</code>	
65	<code>&lt;220&gt; &lt;223&gt; oligómero sintético, cebador del promotor</code>	
70	<code>&lt;220&gt; &lt;221&gt; promotor &lt;222&gt; (1)..(27) &lt;223&gt;</code>	

# ES 2 392 445 T3

	<400> 33 aatttaatac gactcactat agggagacct ttcctctcc atgcctg	47
5	<210> 34 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligómero sintético, cebador del promotor	
15	<220> <221> promotor <222> (1)..(27) <223>	
	<400> 34 aatttaatac gactcactat agggagagaa tgaatttcc tccagcaaca tg	52
20	<210> 35 <211> 56 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> oligómero sintético, cebador del promotor	
30	<220> <221> promotor <222> (1)..(27) <223>	
35	<400> 35 aatttaatac gactcactat agggagaaca agaattgaat ttctccagc aacatg	56
40	<210> 36 <211> 54 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> oligómero sintético, cebador del promotor	
50	<220> <221> promotor <222> (1)..(27) <223>	
55	<400> 36 aatttaatac gactcactat agggagaaca agaattgaat ttctccagc aaca	54
60	<210> 37 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligómero sintético, cebador del promotor	
60	<220> <221> promotor <222> (1)..(27) <223>	

# ES 2 392 445 T3

	<400> 37 aatttaatac gactcactat agggagacaa gaattgaatt tcctccagca ac	52
5	<210> 38 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligómero sintético, cebador del promotor	
15	<220> <221> promotor <222> (1)..(27) <223>	
	<400> 38 aatttaatac gactcactat agggagaaag aattgaattt cctccagca c	51
20	<210> 39 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> oligómero sintético, cebador del promotor	
30	<220> <221> promotor <222> (1)..(27) <223>	
35	<400> 39 aatttaatac gactcactat agggagaaca agaattgaat ttctccagc aac	53
40	<210> 40 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> oligómero sintético, cebador del promotor	
50	<220> <221> promotor <222> (1)..(27) <223>	
55	<400> 40 aatttaatac gactcactat agggagaccacaagaattga atttctcca gc	52
60	<210> 41 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligómero sintético, cebador del promotor	
60	<220> <221> promotor <222> (1)..(27) <223>	

## ES 2 392 445 T3

```

<400> 41
aathtaatac gactcactat agggagactc 52      tgagccaatc ttggatgaac tc

5  <210> 42
    <211> 52
    <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial

10 <220>
    <223> oligómero sintético, cebador del promotor

    <220>
    <221> promotor
    <222> (1)..(27)
15 <223>

    <400> 42
    aathtaatac gactcactat agggagacag acaatttc catcatgaca gt      52

20 <210> 43
    <211> 55
    <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial

25 <220>
    <223> oligómero sintético, cebador del promotor

    <220>
    <221> promotor
30 <222> (1)..(27)
    <223>

    <400> 43
    aathtaatac gactcactat agggagaggt cataaaatct cattctccac caatc      55

35 <210> 44
    <211> 56
    <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial

40 <220>
    <223> oligómero sintético, cebador del promotor

    <220>
    <221> promotor
45 <222> (1)..(27)
    <223>

    <400> 44
50 aathtaatac gactcactat agggagagaa acactggta taaaatctca ttctcc      56

    <210> 45
    <211> 52
    <212> ADN
55 <213> Secuencia Artificial

    <220>
    <223> oligómero sintético, cebador del promotor

60 <220>
    <221> promotor
    <222> (1)..(27)
    <223>

```

# ES 2 392 445 T3

	<400> 45 aatttaatac gactcactat agggagaggt cacaaatgaa acactggtca ta	52
5	<210> 46 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligómero sintético, cebador del promotor	
15	<220> <221> promotor <222> (1)..(27) <223>	
	<400> 46 aatttaatac gactcactat agggagagaa aggtcacaaa tgaacactg gtc	53
20	<210> 47 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> oligómero sintético, cebador del promotor	
30	<220> <221> promotor <222> (1)..(27) <223>	
35	<400> 47 aatttaatac gactcactat agggagaaaa ggtcacaaat gaaacactgg tc	52
40	<210> 48 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> oligómero sintético, cebador del promotor	
50	<220> <221> promotor <222> (1)..(27) <223>	
55	<400> 48 aatttaatac gactcactat agggagagaa aggtcacaaa tgaacactg g	51
60	<210> 49 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligómero sintético, cebador del promotor	
60	<220> <221> promotor <222> (1)..(27) <223>	

# ES 2 392 445 T3

	<400> 49 aatttaatac gactcactat agggagacaa atcatgaaag gtcacaaatg aaa	53
5	<210> 50 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
	<400> 50 agagaaacag attaaagaac cc	22
15	<210> 51 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
25	<400> 51 ggaagaaaga agacagaaag cgtgaa	26
30	<210> 52 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
35	<400> 52 ggaagaaaga agacagaaag cgtg	24
40	<210> 53 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
	<400> 53 gaagaaaga gacagaaagc gtg	23
50	<210> 54 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
	<400> 54 tggaagaaag aagacagaaa gcgtg	25
60	<210> 55 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	

<220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
  
 <400> 55  
 5 tggaagaaag aagacagaaa gcgt 24  
  
 <210> 56  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
  
 <400> 56  
 15 ctggaagaaa gaagacagaa agcg 24  
  
 <210> 57  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
 25  
 <400> 57  
 gcaaggggag agccctggaa gaaag 25  
  
 <210> 58  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
 35  
 <400> 58  
 cagtatttat aattcaaca gtcacag 27  
  
 <210> 59  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
  
 <400> 59  
 50 tctcaacaaa ccaattatgt g 21  
  
 <210> 60  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
  
 <400> 60  
 60 catgactctc aacaaccaa ttatgtg 27  
  
 <210> 61  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia Artificial

	<220>		
	<223> oligómero sintético, cebador		
5	<400> 61 caattgcttc cttaacataa actg	24	
	<210> 62 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
10			
	<220>		
	<223> oligómero sintético, cebador		
15	<400> 62 cgatcaattg cttccttaac ataaac	26	
	<210> 63 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
20			
	<220>		
	<223> oligómero sintético, cebador		
25	<400> 63 ccttttctc tccatgcctg	20	
	<210> 64 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
30			
	<220>		
	<223> oligómero sintético, cebador		
35	<400> 64 gaattgaatt tctccagca acatg	25	
	<210> 65 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
40			
	<220>		
	<223> oligómero sintético, cebador		
45	<400> 65 acaagaattg aatttctcc agcaacatg	29	
	<210> 66 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
50			
	<220>		
	<223> oligómero sintético, cebador		
55	<400> 66 acaagaattg aatttctcc agcaaca	27	
	<210> 67 <211> 25		
60			

<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> oligómero sintético, cebador  
  
 <400> 67  
 caagaattga atttctcca gcaac 25  
  
 10 <210> 68  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
  
 <400> 68  
 20 aagaattgaa tttctccag caac 24  
  
 <210> 69  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
  
 <400> 69  
 30 acaagaattg aatttctcc agcaac 26  
  
 <210> 70  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
  
 <400> 70  
 40 ccacaagaat tgaatttct ccagc 25  
  
 <210> 71  
 <211> 25  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
 50  
 <400> 71  
 ctctgagcca atctggatg aactc 25  
  
 <210> 72  
 55 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 60 <223> oligómero sintético, cebador  
  
 <400> 72  
 cagaacaatt ttccatcatg acagt 25

<210> 73  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
 <400> 73  
 10 ggtcataaaa tctcattctc caccaatc 28  
 <210> 74  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
 20 <400> 74  
 gaaacactgg tcataaaatc tcattctcc 29  
 <210> 75  
 <211> 25  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
 30 <400> 75  
 ggtcacaaat gaaacactgg tcata 25  
 <210> 76  
 <211> 26  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 40 <223> oligómero sintético, cebador  
 <400> 76  
 gaaaggtcac aatgaaaca ctggtc 26  
 45 <210> 77  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
 <400> 77  
 55 aaaggtcaca aatgaaacac tggtc 25  
 <210> 78  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
 <400> 78  
 65 gaaaggtcac aatgaaaca ctgg 24

<210> 79  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
  
 10 <400> 79  
 caaatcatga aaggtcacia atgaaa 26  
  
 <210> 80  
 <211> 19  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
 20  
 <400> 80  
 gactgatag ctaccgcc 19  
  
 <210> 81  
 <211> 23  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 30 <223> oligómero sintético, cebador  
  
 <400> 81  
 actgatag ctaccgcc ttg 23  
  
 35 <210> 82  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
  
 <400> 82  
 45 ctgatagct caccgccgt tgc 23  
  
 <210> 83  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador  
  
 <400> 83  
 55 ctgatagct caccgccgt tgcc 24  
  
 <210> 84  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador

	<400> 84 cuugatacct caccgccggt tg	22
5	<210> 85 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
	<400> 85 cuugatacct caccgccggt tgc	23
15	<210> 86 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
25	<400> 86 gcagatagaa tgcttgatt gtctgg	26
30	<210> 87 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
	<400> 87 gcagatagaa tgcttgatt gtctg	25
40	<210> 88 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
	<400> 88 cagatagaat gcttgattg tctgg	25
50	<210> 89 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
	<400> 89 tctccttta taatagcaac tcaaattgg	30
60	<210> 90 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> oligómero sintético, cebador	

	<400> 90 ctccttttat aatagcaact tcaaattgg	29
5	<210> 91 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
15	<400> 91 ttataatagc aactcaaat tggtc	25
20	<210> 92 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
25	<400> 92 ggcaacatta gtgacaactg	20
30	<210> 93 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
35	<400> 93 ggcaacatta gtgacaactg ttaatgg	27
40	<210> 94 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
50	<400> 94 caggcatgga gaggaaaa	18
55	<210> 95 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
60	<400> 95 caggcatgga gaggaaaagg	20
	<210> 96 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	

	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
5	<400> 96 cagcatgga gaggaaaag	19
10	<210> 97 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
15	<400> 97 ggcatggaga ggaaaagg	18
20	<210> 98 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
25	<400> 98 taagaaaatt gaaatgcaga gaa	23
30	<210> 99 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
35	<400> 99 ctccaaaacg ctttttagaa agagtc	26
40	<210> 100 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> oligómero sintético	
50	<400> 100 ccatgattaa tttcctgca gc	22
55	<210> 101 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
60	<400> 101 ccaaaacgct ttttagaaag agtccc	26
65	<210> 102 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	

	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
5	<400> 102 cgctgagttt gagcagaatt tagaa	25
	<210> 103 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10		
	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
15	<400> 103 ctgagtttga gcagaattta gaaaatgc	28
	<210> 104 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20		
	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
25	<400> 104 atgcatggct atgagtttta tcag	24
	<210> 105 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30		
	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
35	<400> 105 gcatggctat gagttttatc agaaat	26
40	<210> 106 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45		
	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
50	<400> 106 gcauggctat gagttttatc agaaatt	27
	<210> 107 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55		
	<220> <223> oligómero sintético, cebador	
60	<400> 107 catggctatg agttttatca gaaatt	26
	<210> 108 <211> 27	

<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> oligómero sintético, cebador  
  
 <400> 108  
 gcatggctat gagtttatc agaaatt 27  
  
 10 <210> 109  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> sonda del oligómero sintético  
  
 <400> 109  
 gccgttgcc taggctatag 20  
 20  
 <210> 110  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> oligómero sintético  
  
 <400> 110  
 ctatagccta ggcaaacggc 20  
 30  
 <210> 111  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35  
 <220>  
 <223> sonda del oligómero sintético  
  
 <400> 111  
 cagggttctt taatctgttt ctcta 25  
 40  
 <210> 112  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45  
 <220>  
 <223> oligómero sintético  
 50  
 <400> 112  
 tagagaaaca gattaaagaa ccctg 25  
  
 <210> 113  
 55 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 60 <223> oligómero sintético, sonda  
  
 <400> 113  
 atgatgttg gatttcata ttctgtg 27

<210> 114  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> oligómero sintético  
  
 <400> 114  
 10 cacagaatga tgaaatccaa acatcat 27  
  
 <210> 115  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, sonda  
  
 <400> 115  
 20 ggtcaaatcc aagtccaaaa ac 22  
  
 <210> 116  
 <211> 22  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligómero sintético  
 30  
 <400> 116  
 gtttttgac ttgattga cc 22  
  
 <210> 117  
 <211> 20  
 35 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 40 <223> oligómero sintético, sonda  
  
 <400> 117  
 ccuauguuaa uuucugaggg 20  
  
 <210> 118  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> oligómero sintético  
  
 <400> 118  
 55 ccctcagaaa ttaacatagg 20  
  
 <210> 119  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, sonda  
  
 <400> 119  
 65 caggcaugga gaggaaaagg 20

ES 2 392 445 T3

<210> 120  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligómero sintético  
  
 10 <400> 120  
 cctttcctc tcatgcctg 20  
  
 <210> 121  
 <211> 23  
 15 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, sonda  
 20  
 <400> 121  
 ggucuuccug gaaugugugg ugg 23  
  
 <210> 122  
 <211> 23  
 25 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 30 <223> oligómero sintético, sonda  
  
 <400> 122  
 gucuuccugg aauguguggu ggg 23  
  
 35 <210> 123  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> oligómero sintético, sonda  
  
 <400> 123  
 45 tctcctgga atgtggtg g 21  
  
 <210> 124  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> oligómero sintético, sonda  
  
 <400> 124  
 55 tcuuccugga auguguggug g 21  
  
 <210> 125  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> oligómero sintético

ES 2 392 445 T3

	<400> 125 caccacacat.tccaggaaga	20
5	<210> 126 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligómero sintético, sonda	
	<400> 126 cttctctggaa tgtgtggtgg	20
15	<210> 127 <211> 20 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> oligómero sintético, sonda	
25	<400> 127 cuuccuggaa uguguggugg	20
30	<210> 128 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> oligómero sintético, sonda	
	<400> 128 gcugcaggaa aauuaucou gg	22
40	<210> 129 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> oligómero sintético, sonda	
	<400> 129 tggagaaga gaugauagaa uauagg	26
50	<210> 130 <211> 24 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> oligómero sintético, sonda	
	<400> 130 ggagaaugag auuuuauagac cagu	24
60	<210> 131 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> oligómero sintético	

<400> 131  
 actggcata aaatctcatt ctcc 24

5 <210> 132  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador

<220>  
 <221> Sitio Cla I  
 15 <222> (3)..(8)  
 <223>

<220>  
 <221> Sitio de reconocimiento de Cla I  
 20 <222> (3)..(8)  
 <223>

<400> 132  
 ccatcgatgc gtttggaga ctacattc 28

25 <210> 133  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> oligómero sintético, cebador

<220>  
 35 <221> Sitio de reconocimiento de Pst I  
 <222> (4)..(9)  
 <223>

<400> 133  
 40 aaactgcaga tgaagggtcc tacaattcc 29

<210> 134  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> oligómero sintético, cebador

50 <220>  
 <221> Sitio de reconocimiento de Kpn I  
 <222> (4)..(9)  
 <223>

<400> 134  
 55 cggggtaccg cgtttggag actacattc 29

<210> 135  
 <211> 29  
 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> oligómero sintético, cebador

65

<220>  
 <221> Sitio de reconocimiento de Pst I  
 <222> (4)..(9)  
 <223>  
 5  
 <400> 135  
 aaactgcaga gaggtggaac ttactattc 29  
 <210> 136  
 10 <211> 38  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> oligómero sintético  
 <400> 136  
 uuaagccuau auucuaucou cucuuucucc aacagga 38  
 20 <210> 137  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> oligómero sintético  
 <400> 137  
 30 gccccaccac acauuccagg aagacct 27  
 <210> 138  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> oligómero sintético  
 <400> 138  
 40 gcaaggggag agccctggaa gaaagaagac agaaagcgtg aa 42  
 <210> 139  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> oligómero sintético  
 50 <400> 139  
 gaagaaag 8  
 <210> 140  
 <211> 21  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> oligómero sintético  
 60 <400> 140  
 gaagaaagaa gacagaaagc g 21  
 <210> 141  
 65 <211> 42

# ES 2 392 445 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> oligómero sintético	
	<400> 141	
	ccatggtgag gggacttgat acctcaccgc cgttgccta gg	42
10	<210> 142	
	<211> 9	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> oligómero sintético	
	<400> 142	
20	cttgatacc	9
	<210> 143	
	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> oligómero sintético	
	<400> 143	
30	gacttgatac c	11
	<210> 144	
	<211> 22	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligómero sintético	
	<400> 144 22	
40	cttgatacct caccgcggtg tg	22
	<210> 145	
	<211> 19	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligómero sintético	
50	<400> 145 19	
	gatacctcac cgccggttg	19
	<210> 146	
55	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> oligómero sintético	
	<400> 146 17	
	cttgatacct caccgcc	17

# ES 2 392 445 T3

	<210> 147	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> oligómero sintético	
	<400> 147	
10	cgatcaattg cttcctaac ataaactg	28
	<210> 148	
	<211> 22	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligómero sintético	
	<400> 148	
20	caattgcttc cttaacataa ac	22
	<210> 149	
	<211> 31	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligómero sintético	
30	<400> 149	
	ccacaagaat tgaatttctt ccagcaacat g	31
	<210> 150	
35	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
40	<223> oligómero sintético	
	<400> 150	
	gaattgaatt tctccagc	19
45	<210> 151	
	<211> 58	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> oligómero sintético	
	<400> 151	
55	caaatcatga aaggtcacaa atgaaacact ggtcataaaa ttcattctc caccaatc	58
	<210> 152	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> oligómero sintético	
	<400> 152	
65	ggtcacaat gaaactgg	20

# ES 2 392 445 T3

5	<210> 153 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220> <223> oligómero sintético	
10	<400> 153 aaaggtcaca aatgaaacac tgg	23
15	<210> 154 <211> 12 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220> <223> oligómero sintético	
20	<400> 154 gaaacactgg tc	12
25	<210> 155 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220> <223> oligómero sintético	
30	<400> 155 ggtcataaaa tctcattctc c	21
35	<210> 156 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220> <223> oligómero sintético	
40	<400> 156 cagatagaat gcttgattg tctg	24
45	<210> 157 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220> <223> oligómero sintético	
50	<400> 157 tctccttta taatagcaac tcaaattgg tc	32
55	<210> 158 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220> <223> oligómero sintético	
60	<210> 158 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220> <223> oligómero sintético	

	<400> 158 ttataatagc aacttcaaat tgg	23
5	<210> 159 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligómero sintético	
	<400> 159 ggcatggaga ggaaaa	16
15	<210> 160 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> oligómero sintético	
	<400> 160 ggcatggaga ggaaaag	17
25	<210> 161 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> oligómero sintético	
	<400> 161 ctccaaaacg ctttttagaa agagtccc	28
40	<210> 162 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligómero sintético	
45	<400> 162 ccaaaacgct ttttagaaag agtc	24
50	<210> 163 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligómero sintético	
55	<400> 163 cgctgagttt ggcagaatt tagaaaatgc	30
60	<210> 164 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> oligómero sintético	

# ES 2 392 445 T3

	<400> 164 ctgagttga gcagaattta gaa	23
5	<210> 165 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligómero sintético	
15	<400> 165 atgcatggct atgagtttta tcagaaatt	29
20	<210> 166 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> oligómero sintético	
30	<400> 166 catggctatg agttttatca g	21
35	<210> 167 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> oligómero sintético	
45	<400> 167 gcatggctat gagttttatc ag	22
50	<210> 168 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> oligómero sintético, sonda de captura	
60	<400> 168 catggctatg agttttatca gaaat	25
65	<210> 169 <211> 58 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
70	<220> <223> oligómero sintético, sonda de captura	
75	<400> 169 gttgctata cctaaagtca tgaatcctaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa	58
80	<210> 170 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	

# ES 2 392 445 T3

	<220>		
	<223> oligómero sintético, cebador		
5	<400> 170 cccctagaaa acccatcctc t	21	
	<210> 171		
	<211> 52		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> oligómero sintético, cebador del promotor		
15	<220>		
	<221> promotor		
	<222> (1)..(27)		
	<223>		
20	<400> 171 aatthaatac gactcactat agggagaagt accgggtagt tgtacgctaa ct	52	
	<210> 172		
	<211> 25		
25	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> oligómero sintético, cebador		
30	<400> 172 agtaccgggt agttgtacgc taact	25	
	<210> 173		
35	<211> 20		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
40	<223> oligómero sintético, sonda		
	<400> 173 gucauggaca guuaucugac	20	
45	<210> 174		
	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia Artificial		
50	<220>		
	<223> oligómero sintético, sonda		
	<400> 174 guauuaucua gugaagacuu ac	22	
55			

**REIVINDICACIONES**

1. Una combinación de al menos dos oligómeros para la amplificación de una región diana de VHA que comprende:
  - 5 oligómeros de 23 a 26 nt contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 138 que incluyen por lo menos la secuencia de SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 140, u oligómeros con un tamaño dentro de un intervalo de 19 a 25 nt contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 141, que contienen al menos una secuencia de SEQ ID NOs 142 a 146, u oligómeros cebadores promotores con un tamaño dentro de un intervalo de 50 a 53 nt, que incluyen porciones específicas de una diana de VHA de una cualquiera entre SEQ ID NOs 21 a 27.
2. La combinación de al menos dos oligómeros de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionados entre el
  - 10 grupo que consiste en: SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144 y SEQ ID NO: 145.
3. La combinación de al menos dos oligómeros de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende
  - 15 adicionalmente al menos un oligómero de una sonda de captura seleccionado entre el grupo consistente en SEQ ID NOs 1 a 7 o una secuencia específica de una diana fijada covalentemente a una secuencia o a un resto que se une a una sonda inmovilizada, seleccionándose dicha secuencia específica de una diana entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs 8 a 14.
4. La combinación de al menos dos oligómeros de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho al menos
  - 20 un oligómero de captura se selecciona entre el grupo consistente en SEQ ID NOs 2, 3 y 4 o una secuencia específica de una diana ligada covalentemente a una secuencia o a un resto que se une a una sonda inmovilizada, seleccionándose dicha secuencia específica de una diana entre el grupo consistente en SEQ ID NOs 9, 10 y 11.
5. La combinación de al menos dos oligómeros de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende
  - 25 adicionalmente al menos un oligómero de una sonda de detección seleccionado entre el grupo consistente en SEQ ID NO 109 y SEQ ID NO: 111.
6. La combinación de al menos dos oligómeros de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dichos al menos
  - 30 dos oligómeros comprenden un primer oligómero de amplificación seleccionado entre el grupo consistente en SEQ ID NOs 21 a 27 y un segundo oligómero de amplificación seleccionado entre el grupo consistente en SEQ ID NOs 15 a 18 y 80 a 85.
7. La combinación de al menos dos oligómeros de acuerdo con la reivindicación 6, en donde uno de dichos al
  - menos dos oligómeros es SEQ ID NO: 16 y el otro de dichos al menos dos oligómeros es SEQ ID NO: 22.
8. La combinación de al menos dos oligómeros de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicha
  - 35 composición comprende adicionalmente al menos un oligómero de captura seleccionado entre el grupo consistente en SEQ ID NOs 2, 3 y 4.
9. La combinación de al menos dos oligómeros de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicha
  - combinación comprende adicionalmente al menos una sonda de detección seleccionada entre el grupo consistente en SEQ ID NOs 109 y 111.
10. La combinación de al menos dos oligómeros de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicha
  - 40 combinación comprende adicionalmente al menos un oligómero de captura seleccionado entre el grupo consistente en SEQ ID NOs 2 a 4.
11. La combinación de al menos dos oligómeros de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicha
  - combinación comprende adicionalmente al menos una sonda de detección seleccionada entre el grupo consistente en SEQ ID NOs 109 y 111.
- 45 12. Un kit que comprende una combinación de al menos dos oligómeros de acuerdo con la reivindicación 1.
13. Un método para detectar la presencia de VHA en una muestra que comprende las etapas de:
  - purificar un ácido nucleico de VHA a partir de otros componentes en una muestra que contiene VHA;
  - amplificar una secuencia diana de VHA en el ácido nucleico purificado de VHA, o un ADNc obtenido a partir del mismo, empleando una reacción de amplificación *in vitro* que incluye al menos dos oligómeros de la amplificación,
  - 50 específicos de una región diana de VHA seleccionada, que incluyen:
    - oligómeros de 23 a 26 nt contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 138 que incluyen por lo menos la

secuencia de SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 140, u oligómeros con un tamaño dentro de un intervalo de 19 a 25 nt contenidos en la secuencia de SEQ ID NO: 141, que contienen al menos una secuencia de SEQ ID NOs 142 a 146, u oligómeros cebadores promotores con un tamaño dentro de un intervalo de 50 a 53 nt, que incluyen porciones específicas de una diana de VHA de una cualquiera entre SEQ ID NOs 21 a 27;

5 para producir un producto amplificado de una región diana de VHA seleccionada; y

detectar el producto amplificado empleando una sonda de detección que se hibrida específicamente con al menos una porción del producto amplificado.

10 14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la etapa de purificación pone en contacto la muestra con al menos un oligómero de una sonda de captura que comprende una secuencia contenida en una cualquiera entre SEQ ID NOs 1 a 7 o una secuencia específica de una diana fijada covalentemente a una secuencia o a un resto que se une a una sonda inmovilizada, seleccionándose dicha secuencia específica de una diana entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs 8 a 14, en donde dicho oligómero de una sonda de captura se hibrida específicamente con una secuencia en el ARN de VHA para formar un complejo de hibridación con el ARN de VHA, y se separa el complejo de hibridación que contiene el ARN de VHA de otros componentes de la muestra.

15 15. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la etapa de amplificación amplifica una secuencia empleando al menos dos oligómeros específicos de la primera región diana de VHA seleccionados entre el grupo consistente en: SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144 y SEQ ID NO: 145; y en donde la etapa de detección emplea al menos una sonda de detección que se hibrida específicamente con el producto amplificado.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde en dicha etapa de detección dicho oligómero de detección se selecciona entre el grupo consistente en SEQ ID NOs 109 y 111.

25 17. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dichos al menos dos oligómeros de amplificación comprenden un primer oligómero de amplificación seleccionado entre el grupo consistente en SEQ ID NOs 21 a 27 y un segundo oligómero de amplificación seleccionado entre el grupo consistente en SEQ ID NOs 15 a 18 y 80 a 85.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde uno de dichos al menos dos oligómeros de amplificación es SEQ ID NO: 16 y otro de dichos al menos dos oligómeros es SEQ ID NO: 22.

30 19. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde en dicha etapa de purificación se pone en contacto la muestra con al menos un oligómero de captura seleccionado entre el grupo consistente en SEQ ID NOs 2, 3 y 4.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicha etapa de purificación comprende la etapa de capturar un ácido nucleico de VHA introduciendo al menos un oligómero de captura dentro de dicha muestra.

35 21. El método de acuerdo con la reivindicación 20, en donde dicho al menos un oligómeros de captura se selecciona entre el grupo consistente en SEQ ID NOs 2, 3 y 4 o una secuencia específica de una diana unida covalentemente a una secuencia o a un resto que se une a una sonda inmovilizada, en donde dicha secuencia específica de una diana se selecciona entre el grupo consiste en SEQ ID NOs 9 y 10 y 11.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicha sonda de detección se selecciona entre el grupo consistente en SEQ ID NOs 109 y 111.

40 23. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicha etapa de purificación pone en contacto la muestra con al menos un oligómero de captura seleccionado entre el grupo consistente en SEQ ID NOs 2, 3 y 4.

24. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicha sonda de detección se selecciona entre el grupo consistente en SEQ ID NOs 109 y 111.