

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 871**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12P 19/34** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2003 E 10158028 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2012 EP 2210957**

54 Título: **Polinucleótidos para la amplificación y detección de Neisseria gonorrhoeae**

30 Prioridad:

**12.11.2002 US 292420**

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

**15.02.2013**

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)  
DEPARTMENT D377/AP6A-1 100 ABBOTT PARK  
ROAD  
ABBOTT PARK, ILLINOIS 60064-6008, US**

72 Inventor/es:

**PABICH, EDWARD, K.;  
MARSHALL, RONALD, L. y  
YU, HONG**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 395 871 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

**Polinucleótidos para la Amplificación y Detección de *Neisseria gonorrhoeae*****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a *Neisseria gonorrhoeae*. En particular, la invención se refiere a una composición de polinucleótidos y métodos para amplificar y detectar *Neisseria gonorrhoeae*.

**10 Antecedentes de la Invención**

*Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis* o M y *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae* o NG) son los agentes causantes de enfermedades comunes de transmisión sexual. La CT causa el linfogranuloma venéreo, diversas patologías inflamatorias de los sistemas urogenitales masculinos y femeninos, y el tracoma, una enfermedad crónica que afecta a 500 millones de personas y puede llevar a la ceguera. Cuando no se diagnostica precozmente y se trata mediante la terapia adecuada, la uretritis y la cervicitis inducidas por CT pueden conducir a una variedad de inflamaciones crónicas, tales, como, por ejemplo, vaginitis, salpingitis e inflamación pélvica que pueden dar como resultado esterilidad y embarazo extrauterino. Además, los recién nacidos de madres infectadas pueden contraer infecciones pulmonares y/u oculares durante el parto.

*N. gonorrhoeae*, el patógeno de la gonorrea, se manifiesta como una inflamación purulenta e hinchazón de la uretra en los hombres. Estos síntomas se producen en 90% de los casos de infección. Si se deja sin tratamiento, la infección puede ascender y después de varias semanas producir síntomas de prostatitis. En las mujeres, no se producen o sólo se producen síntomas leves en 50% de los casos de infección. La infección afecta principalmente al cérvix, pero también a la uretra. En 10 y 15% de las mujeres, la infección se disemina a las trompas de Falopio y también puede conducir a esterilidad. Dado que el curso de las infecciones a menudo es asintomático, muchos portadores contribuir sin saberlo a la propagación de la enfermedad.

Teniendo en cuenta el impacto que tienen estos dos organismos, las pruebas de diagnóstico rápido y específico son de suma importancia. El diagnóstico basado en el crecimiento selectivo de las bacterias patogénicas ha sido la norma, pero el cultivo de células consume mucho tiempo y muchos productos aislados clínicos son difíciles de cultivar in vitro. La infección con bacterias da como resultado la formación de una variedad de anticuerpos con serogrupo, especie, subespecie, serovariedad (serotipo) y especificidad de auxotipo. Los sueros de pacientes con infecciones del tracto genital se han utilizado para diagnosticar la infección por CT y NG, sin embargo los ensayos basados en marcas serológicas son por naturaleza no cuantitativos y están sujetos a dificultades en la interpretación. Por ejemplo, los títulos de anticuerpos pueden ser indetectables en infecciones agudas (falso negativo), pueden persistir en individuos no infectados con una historia pasada de infección (falso positivo), pueden producir una indicación de falso positivo debido a la presencia de especies de reacción cruzada (por ejemplo, infección respiratoria por diferentes especies de *Chlamydia*), o pueden no desarrollarse en absoluto (falso negativo) dependiendo de otros factores (Ngeow, 1996, Ann Acad Med 25:300 Singapur; Black et al., 1991, J Clin Microbiol 29:1312). Por estas razones, la serología sola no es adecuada para el diagnóstico de las infecciones por CT y NG.

Las infecciones bacterianas también pueden ser diagnosticadas mediante la detección de secuencias de ácidos nucleicos particulares para el organismo infeccioso. Dependiendo de la secuencia de ácido nucleico seleccionada para la detección, un ensayo diagnóstico puede ser específico para un género entero, más de un género, una especie o subespecie, auxotipo, serovariedad (serotipo), cepa u otro subconjunto de organismos. Esta selectividad puede ser explotada en el desarrollo de ensayos diagnósticos fiables sencillos de las especies *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* de patógenos bacterianos.

El documento EP 0 919 633 A2 describe métodos para detectar la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* a través de la detección de su genoma amplificado. También se describe un conjunto de oligonucleótidos que se van a utilizar como cebadores para la amplificación del genoma de *N. gonorrhoeae* y como sondas para la detección de tal genoma amplificado.

El documento US 5 550 040 A describe métodos, reactivos y kits para la amplificación simultánea y la detección de secuencias de nucleótidos de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*. En particular, se describen los cebadores para la amplificación del genoma de *N. gonorrhoeae* y una sonda para la detección de tal genoma amplificado.

En el documento US 5 453 355 A, se describen métodos para detectar *N. gonorrhoeae* mediante la amplificación de su genoma a través de la PCR. También se describen las secuencias de nucleótidos adecuadas como cebadores específicos para la amplificación del gen de pilina y sondas para su detección. El documento WO 93/00447 se dirige a la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos diana reacción en cadena de la ligasa para el relleno de

espacios. En particular, se describen los oligonucleótidos que se van a utilizar como cebadores para la amplificación genómica que mapean en el gen de la opacidad (*opa*) de *N. gonorrhoeae*.

5 La inscripción Núm. X52368.1 de la base de datos GenBank Bhat, K.S. et al. "gen *opaF* de *N. gonorrhoeae* para la proteína de opacidad" describe la secuencia de nucleótidos del gen *opaF* de *N. gonorrhoeae*.

Esta información de antecedentes se proporciona con el propósito de dar a conocer la información que solicitante cree que tiene posible relevancia para la presente invención. No se pretende admitir necesariamente, ni se debe considerar, que cualquiera de la información precedente constituye técnica anterior contra la presente invención.

10

### **Compendio de la invención**

15 La presente invención proporciona reactivos polinucleotídicos útiles para la detección de *Neisseria gonorrhoeae*. En particular, la presente invención proporciona cebadores y sondas para los procedimientos de amplificación y detección de ácido nucleico, que detectan específicamente y con sensibilidad varias subespecies o serotipos y auxotipos de *N. gonorrhoeae*.

20 La presente invención proporciona una composición de reactivos polinucleotídicos que comprende polinucleótidos que consisten en las secuencias de los SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10.

La presente invención también proporciona un método de amplificación de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra de ensayo, comprendiendo dicho método:

1. (a) formar una mezcla de reacción que comprende reactivos de amplificación de ácidos nucleicos, una muestra de ensayo que contiene potencialmente una secuencia diana de *Neisseria gonorrhoeae*, y una composición de reactivos polinucleotídicos como se define anteriormente, y
2. (B) someter la mezcla a condiciones de amplificación para generar al menos una copia de una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana.

30 Además, la presente invención proporciona un método para detectar *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra de ensayo, comprendiendo dicho método:

- (a) formar una mezcla de reacción que comprende reactivos para la reacción de amplificación de ácidos nucleicos, una muestra de ensayo que contiene potencialmente una secuencia diana de *Neisseria gonorrhoeae*, y al menos una composición de reactivos polinucleotídicos como se ha definido anteriormente;
- (b) someter la mezcla a condiciones de amplificación para generar al menos una copia de una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana;
- (c) hibridar la sonda a la secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana, para formar un híbrido que comprende la sonda y la secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana; y
- (d) detectar el híbrido como una indicación de la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* en la muestra de ensayo.

40 Además, la presente invención proporciona un kit que comprende:
 

- (a) al menos tres polinucleótidos que comprenden secuencias que consisten en el SEQ ID NO: 8, el SEQ ID NO: 9, y el SEQ ID NO: 10, y
- (b) reactivos de amplificación.

45 Además, cuando la amplificación es mediante PCR o un procedimiento de amplificación mediante termociclación similar, la etapa (b) puede repetirse varias veces para aumentar el número de copias de la secuencia diana.

50 Los polinucleótidos utilizados en la presente invención también se pueden proporcionar como parte de un kit útil para amplificar y/o detectar *N. gonorrhoeae*. Los kits pueden comprender uno o más recipientes adecuados que contienen una composición de acuerdo con la presente invención, una enzima que tiene actividad polimerasa y desoxinucleótidos trifosfato. Al menos una secuencia porta preferiblemente una marca.

55 En otro aspecto de la invención, se incluyen un polinucleótido diana de control y una sonda polinucleotídica de control en cualquiera de los métodos o kits proporcionados en la presente memoria. En este aspecto de la invención, el conjunto de cebadores preferiblemente es complementario a la secuencia diana así como a la diana control, mientras que la sonda diana es preferiblemente complementaria sustancialmente sólo a la secuencia polinucleotídica diana y la sonda control es preferiblemente complementaria sustancialmente sólo a la diana de control.

### **Descripción Detallada de la Invención**

60 La presente invención proporciona una combinación de reactivos polinucleotídicos que comprende polinucleótidos que pueden hibridarse específicamente con una secuencia de ácido nucleico, o complemento de la misma, de *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae* o NG). Esta combinación de polinucleótidos puede usarse para amplificar *N.*

*gonorrhoeae*, y para detectar específicamente la presencia de este organismo. En la actualidad, se conocen 57 auxotipos y serovariedades de *N. gonorrhoeae*, y el método detecta adecuadamente y específicamente todas las cepas conocidas.

5 El término "hibridarse específicamente" según se utiliza en la presente memoria se refiere a la capacidad de un ácido nucleico para unirse de forma detectable y específicamente a un segundo ácido nucleico. Los polinucleótidos se hibridan específicamente con hebras de ácido nucleico diana en condiciones de hibridación y de lavado que minimizan cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos no específicos. Las condiciones restrictivas que se pueden utilizar para lograr una hibridación específica son conocidas en la técnica.

10 Una "secuencia diana" o "secuencia de ácido nucleico diana", según se utiliza en la presente memoria significa una secuencia de ácido nucleico de NG, o complemento de la misma, que es amplificada, detectada, o tanto amplificada como detectada usando uno o más de los polinucleótidos proporcionados en la presente memoria. Adicionalmente, aunque el término secuencia diana a veces se refiere a una secuencia de ácido nucleico de doble hebra, los expertos en la técnica reconocerán que la secuencia diana también puede ser de cadena sencilla. En los casos en los que la diana es de doble hebra, las secuencias cebadoras de polinucleótidos de la presente invención preferiblemente amplificarán ambas hebras de la secuencia diana. Se puede seleccionar una secuencia diana que es más o menos específica para un organismo particular. Por ejemplo, la secuencia diana puede ser específica de un género entero, de más de un género, de una especie o subespecie, serogrupo, auxotipo, serotipo, cepa, producto aislado u otro subconjunto de organismos. Las secuencias de polinucleótidos de la presente invención se seleccionan por su capacidad para hibridarse específicamente con una gama de subespecies o serotipos o auxotipos, de NG.

25 El término "muestra de ensayo" según se utiliza en la presente memoria, significa una muestra tomada de un organismo o fluido biológico que se sospecha que contiene o potencialmente contiene una secuencia diana de NG. La muestra de ensayo puede tomarse de cualquier fuente biológica, tal como, por ejemplo, tejido, sangre, saliva, esputos, mucosidad, sudor, orina, frotis uretral, frotis cervical, frotis urogenital o anal, frotis conjuntival, líquido del cristalino, líquido cerebroespinal, leche, líquido ascítico, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido amniótico, caldos de fermentación, cultivos celulares, mezclas de reacciones químicas y similares. La muestra de ensayo se puede usar (i) directamente como se obtiene de la fuente o (ii) después de un tratamiento previo para modificar el carácter de la muestra. Así, la muestra de ensayo puede ser pre-tratada antes de su uso, por ejemplo, preparando plasma o suero de la sangre, lo que rompe las células o partículas virales, preparando líquidos a partir de materiales sólidos, diluyendo fluidos viscosos, filtrando líquidos, destilando líquidos, concentrando líquidos, inactivando componentes interferentes, añadiendo reactivos, purificando ácidos nucleicos y similares.

35 El término "marca", según se utiliza en la presente memoria significa una molécula o un resto que tiene una propiedad o característica que es susceptible de detección y, opcionalmente, de cuantificación. Una marca puede ser directamente detectable, en forma de, por ejemplo (y sin limitación), radioisótopos, fluoróforos, quimioluminóforos, enzimas, partículas coloidales, micropartículas fluorescentes y similares, o una marca puede ser detectable indirectamente, en forma de, por ejemplo, miembros de unión específica. Se entenderá que las marcas directamente detectables pueden requerir componentes adicionales tales como, por ejemplo, sustratos, reactivos desencadenantes, restos extintores, luz, y similares, para permitir la detección y/o cuantificación de la marca. Cuando se utilizan marcas detectables indirectamente, se utilizan típicamente en combinadas con un "producto conjugado". Un producto conjugado es típicamente un miembro de unión específica que ha sido unido o acoplado a una marca directamente detectable. Las químicas de acoplamiento para la síntesis de un producto conjugado son bien conocidas en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, cualquier medio químico y/o físico que no destruya la propiedad de unión específica del miembro de unión específica o la propiedad detectable de la marca. Según se utiliza en la presente memoria, "miembro de unión específica" significa un miembro de un par de unión, es decir, dos moléculas diferentes donde una de las moléculas a través de, por ejemplo, medios químicos o físicos se une específicamente a la otra molécula. Además de los pares de unión específica de antígenos y anticuerpos, otros pares de unión específica incluyen, pero no se pretende que estén limitados a, avidina y biotina; haptenos y anticuerpos específicos para haptenos; secuencias de nucleótidos complementarias; cofactores o sustratos enzimáticos y enzimas y similares.

55 Un polinucleótido, en el contexto de la presente invención, es un polímero de ácido nucleico de ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN), ARN o ADN modificado, o miméticos de ARN o ADN (tal como, sin limitación APN), y derivados de los mismos, y homólogos de los mismos. Por lo tanto, los polinucleótidos incluyen polímeros compuestos de nucleobases de origen natural, azúcares y enlaces internucleósido covalentes (cadena principal) así como polímeros que tienen porciones de origen no natural que funcionan de manera similar. Tales polímeros de ácidos nucleicos modificados o sustituidos son bien conocidos en la técnica y para los fines de la presente invención, son referidos como "análogos". Para facilitar su preparación y el conocimiento por el experto en la técnica, los polinucleótidos son preferiblemente polímeros modificados o no modificados de ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico.

60

Análogos de polinucleótidos que son útiles en la presente invención incluyen polímeros con cadenas principales modificadas o enlaces internucleosídicos no naturales. De acuerdo con la presente invención, los esqueletos modificados incluyen aquellos que conservan un átomo de fósforo en la cadena principal, tales como fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil- y otros alquil-fosfonatos, así como aquellos que ya no tiene un átomo de fósforo, tales como cadenas principales formadas por enlaces internucleosídicos mediante alquilo de cadena corta o cicloalquilo, heteroátomos mixto y enlaces internucleosídicos mediante alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos de cadena corta o heterocíclicos. Un ejemplo de tal cadena principal que no contiene fósforo es un enlace morfolino (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Núms.: 5.185.444, 5.034.506, y 5.142.047). Como es conocido en la técnica, los polímeros de ácidos nucleicos modificados (análogos) pueden contener uno o más restos de azúcares modificados. Por ejemplo, los restos de azúcares pueden ser modificados por sustitución en la posición 2' con un grupo 2-metoxietoxi (2-MOE) (véase, por ejemplo, Martin et al., (1995) Helv. Chim. Acta, 78:486-504).

La presente invención también contempla análogos que son miméticos del ARN o de ADN, en los que se rempazan tanto el azúcar como el enlace internucleosídico de las unidades de nucleótidos por grupos nuevos. En estos miméticos las unidades de base se mantienen para la hibridación con la secuencia diana. Un ejemplo de tal mimético, que ha demostrado tener excelentes propiedades de hibridación, es un ácido peptidonucleico (APN) (Nielsen et al., (1991) Science, 254:1497-1500; Solicitud de Patente Internacional WO 92/20702. En los compuestos de APN, la cadena principal de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza por una cadena principal que contiene amida, por ejemplo una cadena principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se conservan y se unen directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno azoicos de la porción amida de la cadena principal.

Los polinucleótidos contemplados para su uso en la invención incluyen adicionalmente derivados en los que la molécula de ácido nucleico se ha modificado covalentemente mediante sustitución, medios químicos, enzimáticos, u otros medios apropiados con un resto distinto de un nucleótido de origen natural, por ejemplo con un resto que funciona como una marca, como se describe en la presente memoria.

La presente invención abarca además el uso de homólogos de polinucleótidos que tienen las secuencias de ácidos nucleicos expuestas en los SEQ ID NO: 8-10. Los homólogos son ácidos nucleicos que tienen al menos una alteración en la secuencia primaria expuesta en una cualquiera de los SEQ ID NO: 8-10, que no destruye la capacidad del polinucleótido para hibridarse específicamente con una secuencia diana, como se ha descrito anteriormente. Por consiguiente, una secuencia primaria se puede alterar, por ejemplo, mediante la inserción, adición, delección o sustitución de uno o más de los nucleótidos de, por ejemplo, los SEQ ID NO: 8-10. Por lo tanto, los homólogos que son fragmentos de una secuencia descrita en los SEQ ID NO: 8-10 puede tener una secuencia consecutiva de al menos aproximadamente 7, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o más nucleótidos de las secuencias de ácido nucleico de los SEQ ID NO: 8-10 y conservarán la capacidad de hibridarse específicamente con una secuencia diana, como se ha descrito anteriormente. Normalmente, los homólogos tendrán una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácido nucleico indicada en los SEC ID NO: 3-10. La identidad con respecto a tales secuencias se define en la presente memoria como el porcentaje de nucleótidos en la secuencia candidato que es idéntico a los polinucleótidos conocidos después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad. No se deberán considerar que las delecciones, prolongaciones o inserciones terminales (5' o 3') o internas en la secuencia de nucleótidos afectan a la identidad.

Los polinucleótidos usados en la presente invención comprenden cebadores y sondas que se hibridan específicamente con una secuencia diana de la invención, por ejemplo las moléculas de ácido nucleico que tienen cualquiera de las secuencias de ácido nucleico expuestas en los SEC ID NO: 8-10 incluyendo análogos y/o derivados de dichas secuencias de ácido nucleico, y homólogos de las mismas, que pueden hibridarse específicamente con una secuencia diana de la invención. Como se describe a continuación, los polinucleótidos de la invención pueden ser utilizados como cebadores y/o sondas para amplificar o detectar *N. Gonorrhoeae*.

Los polinucleótidos utilizados de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante mecanismos convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los polinucleótidos se pueden preparar usando síntesis en fase sólida convencional utilizando un equipo disponible comercialmente, tal como el disponible de Applied Biosystems Inc. EE.UU. (Foster City, California), DuPont (Wilmington, Delaware), o Milligen (Bedford, MA). También se pueden preparar fácilmente polinucleótidos modificados, tales como fosforotioatos y derivados alquilados mediante métodos similares conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.464.746; 5.424.414; y 4.948.882.

Los polinucleótidos utilizados de acuerdo con la presente invención se pueden emplear directamente como sondas para la detección, o cuantificación, o ambas, de ácidos nucleicos de NG en una muestra de ensayo. La muestra de ensayo se ponen en contacto con al menos uno de los polinucleótidos de la presente invención en condiciones de hibridación adecuadas y a continuación se detecta la hibridación entre la secuencia diana y al menos uno de los polinucleótidos mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Los polinucleótidos utilizados en la presente invención pueden incorporar una o más marcas detectables.

Las marcas detectables son moléculas o restos que tienen una propiedad o característica que se puede detectar directa o indirectamente y se eligen de manera que la capacidad del polinucleótido para hibridarse con su secuencia diana no resulte afectada adversamente. Los métodos de marcaje de secuencias de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al., (1997 y actualizaciones) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley & Sons, Nueva York).

Las marcas de detección tienen la misma definición que las "marcas" definidas previamente y las "marcas de captura" se utilizan típicamente para separar productos de prolongación independientes, y sondas asociadas con cualquiera de estos productos, de otros reactivos de amplificación. Los miembros de unión específica (como se ha definido previamente) son adecuados para este propósito. Además, las sondas utilizadas de acuerdo con este método pueden ser bloqueadas en sus extremos 3' para que no se prolonguen en condiciones de hibridación. Los métodos para prevenir la prolongación de una sonda son bien conocidos y son una cuestión de elección para un experto en la técnica. Típicamente, la adición de un grupo fosfato al extremo 3' de la sonda será suficiente para los propósitos de bloqueo de la prolongación de la sonda.

En los casos en que las marcas se emplean para detectar productos amplificados por cebadores, las secuencias de los cebadores se pueden marcar opcionalmente con una marca de captura o una marca de detección. La secuencia de la sonda se usa para la hibridación con la secuencia generada por la secuencia del cebador, y típicamente hibrida con una secuencia que no incluye la secuencia del cebador. De manera similar a la secuencia del cebador, la secuencia de la sonda también se puede marcar con una marca de captura o una marca de detección con la salvedad de que cuando el cebador se marca con una marca de captura, la sonda se marca con una marca de detección, y viceversa. Tras la formación de la copia de los híbridos de secuencia/sonda, las marcas diferenciales (es decir, las marcas de captura y de detección) en la secuencia copia y la secuencia sonda pueden usarse para separar y detectar dichos híbridos. En una realización de la presente invención, la detección se realiza de acuerdo con los protocolos utilizados por la instrumentación de Abbott LCx<sup>®</sup> (Abbott Laboratories; Abbott Park, IL) disponible en el mercado.

Los polinucleótidos utilizados de acuerdo con la presente invención son también adecuados para su uso como sondas de captura en ensayos de tipo sándwich. Las sondas de captura y los ensayos de hibridación sándwich son bien conocidos en la técnica. En pocas palabras, la sonda de captura polinucleotídica se une a un soporte sólido y se pone en contacto con una muestra de ensayo bajo condiciones de hibridación adecuadas de manera que se forma un híbrido de sonda:diana entre la sonda de captura y cualquier ácido nucleico diana presente en la muestra de ensayo. Después de una o más etapas de lavado apropiadas, el híbrido de sonda:diana se detecta, por lo general por medio de una segunda sonda de "revelación" o por un anticuerpo específico que reconoce la molécula híbrida. Se considera por tanto que el uso de los polinucleótidos de NG de la invención como una sonda de revelación o de captura, o ambas, en dichos ensayos de hibridación sándwich se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

La presente invención también contempla el uso de los polinucleótidos modificados en los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.627.030 describe un método para amplificar la señal de detección en un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos. En el ensayo descrito, una primera secuencia de la sonda de polinucleótidos se hibrida en condiciones adecuadas con una secuencia diana, el híbrido de sonda:diana se inmunocaptura posteriormente y se inmoviliza. Una segunda sonda polinucleotídica que contiene muchas unidades repetitivas de la secuencia se hibrida a continuación con el componente sonda del híbrido de sonda:diana. La detección se consigue mediante la hibridación de muchas sondas de secuencias de ácidos nucleicos marcadas, una para cada una de las unidades de secuencias repetitivas presentes en la segunda sonda. La unión de múltiples sondas marcadas a la segunda sonda amplifica por tanto la señal de detección y aumenta la sensibilidad del ensayo. El uso de los polinucleótidos de la invención a ensayos de hibridación modificados de este tipo, ya sea directamente como una primera sonda o como una segunda sonda después de la modificación para incorporar unidades de secuencia repetitivas adicionales mediante técnicas convencionales, se considerada por tanto que está dentro del alcance de la presente invención.

#### ***j) Amplificación y detección de secuencias de nucleótidos de NG***

Los polinucleótidos usados en la invención se pueden utilizar como cebadores o sondas para amplificar y/o detectar NG en una muestra de ensayo. La composición proporcionada en la presente memoria comprende dos cebadores y una sonda. Esta composición puede ser empleada de acuerdo con técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Por lo tanto, los cebadores en la composición puede emplearse para amplificar una secuencia diana. En la mayoría de los casos, la sonda hibrida con las copias de la secuencia diana generada por uno de los cebadores y generalmente facilita la detección de todas las copias de la secuencia diana generada durante el curso de la reacción de amplificación. La composición de la invención se puede emplear de acuerdo con procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos para detectar específicamente y con sensibilidad NG cuando los cebadores y la

sonda se combinan. Se contempla que los cebadores y sondas individuales, de la composición proporcionada en la presente memoria se pueden utilizar alternativamente combinados con cebadores y/o sondas que no sean los descritos en la composición proporcionada en la presente memoria.

5 Los procedimientos de amplificación son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de polimerasa (PCR), TMA, la amplificación por círculo rodador, la amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA) y la amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA). Los expertos en la técnica entenderán que para su uso en ciertas técnicas de amplificación se puede necesitar modificar los cebadores, por ejemplo, para la SDA el cebador comprende nucleótidos adicionales cerca de su extremo 5' que constituyen un sitio de reconocimiento para una endonucleasa de restricción. De manera similar, para la NASBA el cebador comprende nucleótidos adicionales cerca del extremo 5' que constituyen un promotor de la ARN polimerasa. Los polinucleótidos modificados de este modo se consideran dentro del alcance de la presente invención.

10 Como es bien conocido en la técnica, se deben tomar en consideración ciertos criterios cuando se selecciona un cebador para una reacción de amplificación. Por ejemplo, cuando se requiere un par de cebadores para la reacción de amplificación, los cebadores deben ser seleccionados de tal manera que se minimice la probabilidad de formar dúplex en 3', y de tal manera que las temperaturas de fusión ( $T_M$ ) sean suficientemente similares para optimizar el recocido a la secuencia diana y minimizar la cantidad de recocido no específico. En este contexto, los polinucleótidos de acuerdo con la presente invención se proporcionan en combinaciones que se pueden utilizar como cebadores en reacciones de amplificación para amplificar específicamente secuencias de ácidos nucleicos diana.

15 El método de amplificación de la presente invención generalmente comprende (a) formar una mezcla de reacción que comprende reactivos de amplificación de ácidos nucleicos, la composición de la presente invención, y una muestra de ensayo que se sospecha que contiene al menos una secuencia diana y (b) someter la mezcla a condiciones de amplificación para generar al menos una copia de una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana.

20 La etapa (b) de los métodos anteriores se puede repetir cualquier número adecuado de veces (antes de la etapa (c) en el método de detección), por ejemplo, mediante ciclación térmica de la mezcla de reacción entre 10 y 100 veces, típicamente entre aproximadamente 20 y aproximadamente 60 veces, más típicamente entre aproximadamente 25 y aproximadamente 45 veces.

25 Los reactivos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen reactivos que son bien conocidos y pueden incluir, pero no se limitan a, una enzima que tiene al menos actividad polimerasa, cofactores enzimáticos tales como magnesio o manganeso; sales; dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) y desoxinucleótidos trifosfato (dNTP), tales como por ejemplo trifosfato de desoxiadenina, trifosfato de desoxiguanina, trifosfato de desoxicitosina y trifosfato de desoxitimina.

30 Las condiciones de amplificación son condiciones que generalmente promueven el recocido y la prolongación de una o más secuencias de ácido nucleico. Es bien sabido que tal recocido es dependiente de una manera más bien predecible de diversos parámetros, incluyendo la temperatura, la fuerza iónica, la longitud de la secuencia, la complementariedad, y contenido de G:C de las secuencias. Por ejemplo, bajar la temperatura en la proximidad de las secuencias de ácido nucleico complementarias promueve el recocido. Para cualquier conjunto dado de secuencias, la temperatura de fusión, o  $T_m$ , puede estimarse por cualquiera de varios métodos conocidos. Típicamente, las aplicaciones de diagnóstico utilizan temperaturas de hibridación que son de aproximadamente 10°C (p. ej., de 2°C a 18°C) por debajo de la temperatura de fusión. La fuerza iónica o la concentración de "sal" también afectan a la temperatura de fusión, puesto que pequeños cationes tienden a estabilizar la formación de dúplex mediante la negación de la carga negativa en el esqueleto fosfodiéster. Las concentraciones típicas de sal dependen de la naturaleza y valencia del catión, pero son fácilmente conocidas por los expertos en la técnica. Del mismo modo, también se sabe que un alto contenido de G:C y el aumento de la longitud de la secuencia estabilizan la formación de dúplex debido a que los emparejamientos G:C implican 3 de enlaces de hidrógeno, cuando los pares A:T tienen solo dos, y debido a que las secuencias más largas tienen más enlaces de hidrógeno que mantienen las secuencias juntas. Por lo tanto, un alto contenido de G:C y longitudes de secuencia más larga afectan a las condiciones de hibridación mediante la elevación de la temperatura de fusión.

35 Una vez se han seleccionado las secuencias para una aplicación de diagnóstico dada, se conocerán el contenido de G:C y la longitud y se pueden tener en cuenta en la determinación exacta de qué condiciones de hibridación abarcarán. Debido a que la fuerza iónica es típicamente optimizada para la actividad enzimática, el único parámetro que se deja variar es la temperatura. Generalmente, la temperatura de hibridación se selecciona cerca de o en la  $T_m$  de los cebadores o sondas. Por lo tanto, la obtención de condiciones de hibridación adecuadas para un determinado cebador/sonda se encuentra en el conocimiento práctico normal de un experto en la técnica.

Como se mencionó anteriormente, las secuencias de cebadores (SEC ID NÚM: 8 y 9) de la composición de la invención pueden, por sí mismas o con polinucleótidos adicionales, utilizarse como cebadores de amplificación de acuerdo con procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos bien conocidos en la técnica. Tales reacciones incluyen, pero no se pretende que estén limitadas a, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.683.195 y 4.683.202, la reacción en cadena de la ligasa (LCR) descrita en el documento EP-A-320 308, y la LCR con espacios "gap LCR" (GLCR) descrita en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.427.930. Cada una de estas reacciones de amplificación ilustrativas genera múltiples copias de una secuencia diana de ADN.

En una realización de la presente invención, el método de detección generalmente comprende (a) formar una mezcla de reacción que comprende reactivos de amplificación de ácidos nucleicos, la composición de la presente invención, y una muestra de ensayo que se sospecha que contiene al menos una secuencia diana, (b) someter la mezcla a condiciones de amplificación para generar al menos una copia de una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana, (c) hibridar la sonda con la secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana, para formar un híbrido que comprende la sonda y la secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana, y (d) detectar el híbrido como una indicación de la presencia de la secuencia diana (NG y/o una secuencia control) en la muestra.

Los amplicones específicos que resultan de la amplificación de secuencias diana de ácido nucleico utilizando los polinucleótidos de la composición de la presente invención, como se ha descrito anteriormente, se pueden detectar por una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, uno o más de los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación pueden marcarse de manera que un se pueda detectar un amplicón directamente por técnicas convencionales posteriores a la reacción de amplificación. Alternativamente, se puede añadir una sonda que consiste en una versión marcada de uno de los cebadores utilizados en la reacción de amplificación, o un tercer polinucleótido diferente de las secuencias de los cebadores que se ha marcado y es complementaria a una región de la secuencia amplificada, después de completar la reacción de amplificación. La mezcla se somete a continuación a condiciones de hibridación y de lavado apropiadas y el marcador se detecta mediante métodos convencionales.

El producto de amplificación producido como antes se puede detectar durante o posteriormente a la amplificación de la secuencia diana. Los métodos para detectar la amplificación de una secuencia diana durante la amplificación se han esbozado anteriormente, y se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.210.015. Se puede emplear electroforesis en gel para detectar los productos de una reacción de amplificación después de su finalización. Alternativamente, los productos de amplificación se hibridan con las sondas, después se separan de otros componentes de reacción y se detectan usando micropartículas y sondas marcadas.

Se apreciará fácilmente que sería ventajoso un procedimiento que permitiera que tuvieran lugar tanto la amplificación como la detección de secuencias de ácidos nucleicos diana simultáneamente en un solo recipiente de reacción sin abrir. Dicho procedimiento evitaría el riesgo de "traspaso" de contaminación en las etapas de procesamiento post-amplificación, y también facilitaría el escrutinio o ensayos de alto rendimiento y la adaptación del procedimiento a la automatización.

Además, este tipo de procedimiento permite la verificación en "tiempo real" de la reacción de amplificación así como una verificación del "criterio de valoración" más convencional.

La presente invención incluye por tanto el uso de los polinucleótidos en un método para amplificar específicamente y detectar secuencias diana de ácidos nucleicos en una muestra de ensayo en un formato de un solo tubo. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la inclusión en el recipiente de reacción de un colorante intercalante tal como SYBR Green o un anticuerpo que detecta específicamente la secuencia de ácido nucleico amplificado. Alternativamente, se puede incluir en la reacción un tercer polinucleótido diferente de las secuencias del cebador, que es complementario a una región de la secuencia amplificada, como cuando se utiliza la composición de la invención.

Para uso en un ensayo como se ha descrito anteriormente, en el que se producen al mismo tiempo tanto la amplificación con cebadores de polinucleótidos como la detección de secuencias diana usando una sonda polinucleotídica en un solo recipiente de reacción sin abrir, la sonda polinucleotídica necesita poseer determinadas propiedades. Por ejemplo, puesto que la sonda estará presente durante la reacción de amplificación, ésta no debería interferir con el progreso de esta reacción y también debería ser estable en las condiciones de reacción. Además, para la verificación en tiempo real de las reacciones, la sonda debería ser capaz de unirse a su secuencia diana en las condiciones de la reacción de amplificación y emitir una señal sólo tras la unión a esta secuencia diana. Los ejemplos de moléculas de sonda que son particularmente bien adecuadas para este tipo de procedimiento incluyen sondas baliza molecular y sondas TaqMan<sup>®</sup>.



La presente invención, por lo tanto, contempla el uso de los polinucleótidos como sondas TaqMan<sup>®</sup>. Como es conocido en la técnica, las sondas TaqMan<sup>®</sup> son sondas de ácidos nucleicos fluorogénicas con doble marcaje compuestas de un polinucleótido complementario a la secuencia diana que está marcado en el extremo 5' con un fluoróforo y en el extremo 3' con un extintor. Las sondas TaqMan<sup>®</sup> se utilizan típicamente como sondas de tiempo real en reacciones de amplificación. En la sonda libre, la cercana proximidad del fluoróforo y el extintor asegura que el fluoróforo se inactiva internamente. Durante la fase de prolongación de la reacción de amplificación, la sonda se escinde por la actividad nucleasa 5' de la polimerasa y el fluoróforo se libera. El fluoróforo liberado puede a continuación emitir fluorescencia y por lo tanto produce una señal detectable.

Sondas de baliza molecular son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, véanse las Patentes de los Estados Unidos Núms: 6.150.097; 5.925.517 y 6.103.476. Básicamente, las balizas moleculares son sondas polinucleotídicas capaces de formar una estructura tallo-bucle (horquilla). El bucle es una estructura de una sola hebra que contiene secuencias complementarias a la secuencia diana, mientras que el tallo generalmente no está relacionado con la secuencia diana y se puede auto-hibridar para formar una región de doble hebra. Los nucleótidos que son complementarios a la secuencia diana y que se puede auto-hibridar también pueden formar parte de la región del tallo. Unido a un brazo del tallo está un resto fluoróforo y en el otro brazo un resto extintor. Cuando el polinucleótido adopta una forma de horquilla, el fluoróforo y el extintor están en estrecha proximidad y la energía emitida por el fluoróforo es absorbida de este modo por el extintor y emitida en forma de calor, dando lugar a una extinción interna del fluoróforo. Tras la unión del polinucleótido a su secuencia diana, el fluoróforo y el extintor se separan espacialmente y el fluoróforo puede emitir fluorescencia produciendo una señal detectable. Preferiblemente, los cebadores y sondas utilizados en la presente invención se seleccionan de tal manera que la sonda se une establemente (por ejemplo, menos del 5% de sonda unida al amplicón se desplaza durante 24 horas en las condiciones de hibridación de la sonda con el amplicón) al amplicón cuando la reacción se enfría desde una temperatura de desnaturalización, por ejemplo, 90°C a 96°C, a una temperatura por debajo de la T<sub>m</sub> para la unión de la sonda con el amplicón.

La presente invención contempla adicionalmente el uso de polinucleótidos usados en la invención como sondas lineales junto con un fluoróforo y un extintor de alta eficacia, tal como los Black Hole Quenchers (BHQ<sup>™</sup>; Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA). Como es conocido en la técnica, la alta eficacia de extinción y la falta de fluorescencia nativa de los colorantes BHQ<sup>™</sup> permite que se produzca la extinción de "ovillo desordenado" en sondas lineales marcadas en un extremo terminal con un fluoróforo y en el otro con un colorante BHQ<sup>™</sup> asegurando así que el fluoróforo no emita fluorescencia cuando la sonda está en solución. Al unirse a su secuencia diana, la sonda se estira, el fluoróforo y el extintor se separan así espacialmente y el fluoróforo emite fluorescencia. El experto en la técnica apreciará que los tintes BHQ<sup>™</sup> también se puede utilizar como el resto extintor en sonda baliza molecular o TaqMan<sup>®</sup>.

Los fluoróforos y extintores adecuados para su uso con los polinucleótidos usados en la presente invención pueden ser determinados fácilmente por un experto en la técnica (véase también, Tyagi et al., Nature Biotechnol., 16:49-53 (1998); Marras et al., Genet. Anal. Biomolec. Ing., 14:151-156 (1999)). Muchos fluoróforos y extintores están disponibles en el mercado, por ejemplo de Molecular Probes (Eugene, OR) o Biosearch Technologies, Inc., (Novato, CA). Los ejemplos de fluoróforos que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, pero no están limitados a, fluoresceína y derivados de fluoresceína tales como una dihalo-dialcoxi( C<sub>1</sub> a C<sub>8</sub>)carboxifluoresceína, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), cumarina y derivados de cumarina, amarillo Lucifer, rojo Texas, tetrametilrodamina, tetracloro-6-carboxifluoresceína, 5-carboxirrodamina, colorantes de cianina y similares. Los extintores incluyen, pero no están limitados a, DABCYL, ácido 4'-(4-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABSYL), 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-maleimida (DABMI), tetrametilrodamina, carboxitetrametilrodamina (TAMRA), colorantes BHQ<sup>™</sup> y similares. Los métodos para acoplar fluoróforos y extintores a los ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica.

La presente invención proporciona una combinación que comprende dos cebadores y al menos una sonda, que se puede utilizar para amplificar y detectar específicamente secuencias diana de ácidos nucleicos en una muestra de ensayo.

De acuerdo con la presente invención, por lo tanto, las combinaciones de dos cebadores y al menos una sonda, como se ha descrito anteriormente, se pueden utilizar en ensayos de amplificación y detección del criterio de valoración, en los que se mide la fuerza de la señal detectable a la conclusión de la reacción de amplificación, o en ensayos de amplificación y detección en tiempo real, en los que la fuerza de la señal detectable se controla durante todo el curso de la reacción de amplificación.

Se conocen en la técnica varios tipos de patrones para ensayos cuantitativos. Por ejemplo, el patrón puede consistir en una curva patrón compilada mediante amplificación y detección de cantidades conocidas de ácidos nucleicos de NG en las condiciones de ensayo. Alternativamente, se puede incluir un patrón interno en la reacción. Dichos patrones internos generalmente comprenden una secuencia de ácido nucleico diana de control y una sonda polinucleotídica de control. El patrón interno puede incluir opcionalmente además un par adicional de cebadores. La

secuencia primaria de estos cebadores de control puede no estar relacionada con los polinucleótidos de la presente invención y específicos para la secuencia de ácido nucleico diana de control.

5 En el contexto de la presente invención, una secuencia de ácido nucleico diana de control es una secuencia de ácido nucleico que:

- (a) puede amplificarse mediante un cebador o par de cebadores de NG que está siendo utilizado en una reacción particular o por diferentes cebadores de control;
- (b) se hibrida específicamente con la sonda de control en condiciones adecuadas; y
- (c) no se hibrida con una sonda específica de NG en las mismas condiciones.

En el contexto de la presente invención, además de cumplir los requisitos convencionales para las moléculas sonda, la sonda polinucleotídica de control para su uso en reacciones de cuantificación:

- (a) se hibrida específicamente con la secuencia de control en condiciones adecuadas;
- (b) no se hibrida con una secuencia NG, a la sonda específica de NG, o a los cebadores específicos de NG en las mismas condiciones, cuando está siendo detectada una secuencia diana de NG;
- (c) incorpora un marcador detectable que es diferente del marcador incorporado en la sonda NG en uso en la misma mezcla de reacción. Las señales generadas por estas diversas marcas cuando se unen a sus respectivas secuencias diana por lo tanto pueden distinguirse y cuantificarse por separado.

El experto en la técnica reconocerá que la secuencia real de ácido nucleico de la diana de ácido nucleico de control y la sonda de control no es importante siempre que ambos cumplen los criterios esbozados anteriormente.

En el contexto de la presente invención, la cantidad de ácido nucleico diana en una muestra de ensayo puede ser cuantificada usando métodos con "criterio de valoración" o métodos en "tiempo real". Un experto en la técnica apreciará que cuando se usan como sondas específicas NG en ensayos cuantitativos, los polinucleótidos utilizados en la presente invención pueden ser sondas de hibridación convencionales, sondas BHQ™ lineales, sondas TaqMan®, o combinaciones o versiones modificadas de las mismas.

La presente invención también contempla la provisión de la composición de la invención junto con una secuencia de ácido nucleico diana de control, que se puede amplificar mediante el par de cebadores especificado, y una sonda polinucleotídica de control para las reacciones cuantitativas. La presente invención proporciona adicionalmente la inclusión de cebadores control, que amplifican específicamente la secuencia de ácido nucleico diana de control, en las reacciones cuantitativas.

Los métodos de amplificación y/o detección en los que se pueden emplear los polinucleótidos de la composición de acuerdo con la presente invención son adecuados para la adaptación como ensayos de alto rendimiento. Los ensayos de alto rendimiento proporcionan la ventaja de procesar muchas muestras simultáneamente y reducir considerablemente el tiempo requerido para escrutar un gran número de muestras. La presente invención, por lo tanto, contempla el uso de los polinucleótidos de la composición de la presente invención en la selección de alto rendimiento o ensayos para detectar y/o cuantificar los ácidos nucleicos de NG en una pluralidad de muestras de ensayo.

Para los ensayos de alto rendimiento, los componentes de reacción están alojados generalmente en un portador o plataforma de receptáculos múltiples, tal como una placa de microtitulación de múltiples pocillos, que permite una pluralidad de reacciones de ensayo que contienen diferentes muestras de ensayo para controlar en el mismo ensayo. La presente invención también contempla ensayos de alto rendimiento altamente automatizados para aumentar la eficacia del procedimiento de escrutinio o ensayo. Muchos sistemas de escrutinio o ensayo de alto rendimiento, están ya disponibles en el mercado, puesto que son posibilidades de automatización para muchos procedimientos tales como el pipeteo de muestras y reactivos, dispensación de líquido, incubaciones controladas, formateo de muestras en micromatrices, termociclación de microplacas y lecturas de microplacas en un detector apropiado, lo que da como resultado un tiempo de procesamiento mucho más rápido.

Los polinucleótidos de acuerdo con la presente invención se pueden proporcionar como parte de un kit que permite la detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos NG. Dichos kits comprenden la composición de polinucleótidos de la invención para su uso como un cebador y/o una sonda. En una realización de la presente invención, los polinucleótidos se proporcionan en los kits combinados para su uso como cebadores para amplificar específicamente ácidos nucleicos de NG en una muestra de ensayo.

En otra realización, los polinucleótidos se proporcionan en los kits en una combinación que comprende al menos dos cebadores y al menos una sonda. En una realización relacionada, los polinucleótidos se proporcionan en una combinación que comprende las secuencias de ácidos nucleicos mostradas en los SEQ ID NO: 8, 9 y 10.

5 Los kits para la detección de ácidos nucleicos de NG puede contener adicionalmente un ácido nucleico diana de control y una sonda polinucleotídica de control. Así, en una realización de la presente invención, los kits comprenden la combinación anterior de polinucleótidos que comprenden al menos dos cebadores y al menos una sonda, junto con una secuencia de ácido nucleico diana de control, que puede amplificarse mediante el par de cebadores especificado, y una sonda polinucleotídica de control. La presente invención proporciona adicionalmente kits que incluyen cebadores control, que amplifican específicamente la secuencia de ácido nucleico diana de control.

10 Los kits pueden incluir opcionalmente reactivos de amplificación, componentes de reacción y/o recipientes de reacción. Típicamente, al menos una secuencia porta un marcador, pero la detección es posible sin éste. Por lo tanto, uno o más de los polinucleótidos proporcionados en el kit pueden tener una marca detectable incorporada o el kit puede incluir reactivos para marcar los polinucleótidos. Uno o más de los componentes del kit se pueden liofilizar y el kit puede comprender reactivos adecuados para la reconstitución de los componentes liofilizados. El kit puede contener adicionalmente instrucciones de uso.

15 La composición de polinucleótidos, los métodos y kits de la presente invención son útiles en entornos clínicos o de investigación para la detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos de NG. De este modo, en estos ajustes la composición de polinucleótidos puede usarse en ensayos para diagnosticar la infección por NG en un sujeto, o para controlar la cantidad de una secuencia diana de ácido nucleico NG en un sujeto infectado con NG. El control de la cantidad de bacterias en un sujeto es particularmente importante para identificar o controlar la respuesta a la terapia anti-bacteriana.

Los cebadores y las sondas útiles para amplificar y/o detectar *Chlamydia trachomatis* (CT) o *Neisseria gonorrhoeae* (NG) se presentan a continuación en la Tabla 1.

25 Los polinucleótidos marcados con (\*) no son parte de la invención reivindicada.

TABLA 1

Polinucleótido	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO
Cebador efector de CT <sup>(*)</sup>	GGGATTCTCG TAACAACAAG TCAGG	1
Cebador directo alternativo de CT <sup>(*)</sup>	GGGATTCDTG TAACAACAAG TCAGG (donde D no es C)	2
Realización preferida del SEQ ID NO: 2 <sup>(*)</sup>	GGGATTCGTG TAACAACAAG TCAGG,	3
Cebador inverso de CT <sup>(*)</sup>	GCTTGCACGA AGTACTCTAG GAG	4
Sonda de CT <sup>(*)</sup>	ATAGCACTAT AGAACTCTGC AA	5
Sonda alternativa de CT <sup>(*)</sup>	CATAGCACTA TAOAACTG CAAGCC	6
Sonda baliza de CT <sup>(*)</sup>	ctggcATAGC ACTATAGAAC TCTGCAAgcc ag	7
Cebador directo de NG	CGACGTACCG GTTTTTGTTT	8
Cebador inverso de NG	CGGCTCCTTA TTCGGTTTGA CC	9
Sonda de NG	ACACCGCCCG GAACCCGA	10
Sonda alternativa de NG <sup>(*)</sup>	GAAACACCGC CCGGAACCCG AT	11
Sonda baliza de NG <sup>(*)</sup>	ctcggACACC GCCCGGAACC CGAG	12

30 En la Tabla 1, las secuencias de las sondas de polinucleótidos complementarias a las secuencias bacterianas se indican en letras mayúsculas; los nucleótidos en minúsculas son auto-complementarios con el fin de formar un tallo de una sonda baliza en condiciones adecuadas, y en algunos casos, los nucleótidos complementarios a las secuencias bacterianas también forman parte del tallo de la sonda baliza autocomplementaria.

35 Los ácidos nucleicos que tienen las secuencias de polinucleótidos de la Tabla 1 pueden combinarse en combinaciones adecuadas para formar un conjunto de cebador/sonda, tal como:

- Conjunto de Sonda y Cebador 1: SEC ID N °: 1, 4, y 5;
- Conjunto de Sonda y Cebador 2: SEC ID N °: 2, 4, y 5;
- Conjunto de Sonda y Cebador 3: SEC ID N °: 3, 4 y 5;
- 40 Conjunto de Sonda y Cebador 4: SEC ID N °: 1, 4, y 6;
- Conjunto de Sonda y Cebador 5: SEC ID N °: 2, 4, y 6;
- Conjunto de Sonda y Cebador 6: SEC ID N °: 3, 4, y 6;
- Conjunto de Sonda y Cebador 7: SEC ID N °: 1, 4, y 7;

Conjunto de Sonda y Cebador 8: SEC ID N °: 2, 4, y 7;  
 Conjunto de Sonda y Cebador 9: SEC ID N °: 3, 4 y 7;  
 Conjunto de Sonda y Cebador 10: SEC ID N °: 8, 9, y 10;  
 Conjunto de Sonda y Cebador 11: SEC ID N °: 8, 9 y 11; y  
 Conjunto de Sonda y Cebador 12: SEC ID N °: 8,9 y 12.

Únicamente el Conjunto de Sonda y Cebador 10 anterior está de acuerdo con la invención. Los siguientes ejemplos tienen solamente fines ilustrativos y no se debe interpretar que limitan el alcance de esta invención de ninguna manera.

**EJEMPLOS**

Los siguientes ejemplos demuestran la detección de varios subtipos de CT y NG utilizando los conjuntos de cebador/sonda descritos anteriormente. Estos cebadores y sondas de ADN que comprenden los conjuntos de cebador/sonda identificados como SEQ ID NO: 1-7 son específicos para CT, y los SEQ ID NOS: 8-12 son específicos para NG.

En los siguientes ejemplos, los SEQ ID NO: 1 y 4 se usan como cebadores de amplificación consenso específicos para la secuencia diana de CT. Los SEQ ID NO: 6 o 7 se usan como sondas de hibridación interna consenso para el producto de amplificación de CT. Los SEQ ID NO: 8 y 9 se utilizan como cebadores de amplificación consenso específicos para la secuencia diana de NG y los SEQ ID NO: 10 o 12 se utilizan como sondas de hibridación interna consenso para el producto de amplificación de NG. La parte de los ejemplos que se refieren a la detección de CT no es parte de la invención reivindicada.

**Ejemplo 1**

**Preparación de cebadores y sondas**

**A. Cebadores consenso de CT y NG**

Los cebadores consenso fueron diseñados para detectar todos los subtipos conocidos de CT o NG mediante PCR de hibridación de oligonucleótidos. En los siguientes ejemplos, estos cebadores fueron el SEQ ID NO: 1 y el SEQ ID NO: 4 para CT, y el SEQ ID NO: 8 y el SEQ ID NO: 9 para NG. Se encontró que el SEQ ID NO: 3 tenía algunas ventajas relativas sobre el SEQ ID NO: 1 para algunas realizaciones de la presente invención, que se refieren a la facilidad de purificación de estos polinucleótidos. Sin embargo, esas realizaciones no se ilustran a continuación, y los autores de la presente invención prefieren el uso del SEQ ID NO: 1 al uso del SEQ ID NO: 3.

**B. Sondas consenso CT y NG**

Las sondas consenso fueron diseñadas para hibridarse con la secuencia diana de CT o NG amplificada mediante hibridación de oligonucleótidos. Estas secuencias de la sonda fueron modificadas para su uso como sondas en un ensayo de baliza molecular mediante la adición de nucleótidos terminales para generar extremos 5' y 3' auto-complementarios, y restos fluorescentes (fluo) y extintores en los extremos opuestos del polinucleótido (véase la Tabla 2). Así, la secuencia de la sonda de CT del SEQ ID NO: 6 fue la base de la sonda baliza molecular del SEQ ID NO: 7, y la secuencia de la sonda de NG del SEQ ID NO: 10 fue la base de la sonda baliza molecular del SEQ ID NO: 12. Cuando se utilizaron más de una sonda baliza simultáneamente en el mismo ensayo de baliza molecular, se utilizaron restos fluorescentes con diferentes perfiles de excitación-emisión para distinguir entre las diferentes señales de la sonda.

Las secuencias de la sonda se sintetizaron usando la metodología de síntesis de oligonucleótidos convencional.

TABLA 2

	Secuencia (5'-3')
Sonda baliza de CT	Flúor-ctggcATAGC ACTATAGAAC TCTGCAAgcc ag-extintor
Sonda baliza de NG	Flúor-ctcggACACC GCCCGGAACC CGAG-extintor

**Ejemplo 2**

**Preparación de la Muestra de ADN**

El ADN de CT se aisló del serotipo Ba de CT, cepa Apache-2 (ATCC VR-347. Rockville, Maryland), usando métodos conocidos en la técnica, y se utilizó para evaluar la sensibilidad, especificidad y reactividad cruzada de los conjuntos

de cebador/sonda consenso de CT. El ADN de NG se preparó de forma similar y se utilizó para evaluar la sensibilidad, especificidad y reactividad cruzada de los conjuntos de cebador/sonda consenso de CT.

5 En las muestras de control negativas ("Neg"), se sustituyó un volumen igual de diluyente por el ADN de muestra. Se incluyeron como control positivo diversas concentraciones de ADN de muestra de una concentración conocida (".12x", "1x", "10x").

10 Se diseñó un polinucleótido diana de control interno (CI) como control positivo para la amplificación, para su uso con los cebadores de CT y NG. La secuencia diana para la amplificación fue complementaria a un cebador de CT en un extremo y a un cebador de NG en el otro extremo, de tal manera que en presencia de ambos cebadores la secuencia de control se amplificaría en condiciones de amplificación. El polinucleótido se diseñó para producir un amplicón complementario a una sonda de control, por ejemplo una sonda baliza molecular, pero no complementaria a las sondas en uso para la detección de CT o NG. Este polinucleótido diana de control se preparó usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

15 **Ejemplo 3 (Comparativo)**

**Sensibilidad de la Detección de TC**

20 El ADN de CT se preparó como se describe en el Ejemplo 2. Se evaluó el conjunto de cebador/sonda 7 (es decir, el SEQ ID NO: 1 y 4 se utilizaron como cebadores y el SEQ ID NO: 7 como sonda). Todas las secuencias se prepararon como se describe en el Ejemplo 1.

25 Las diluciones del ADN de CT aislado se amplificaron mediante PCR y se detectaron usando el conjunto de cebador/sonda 7. La PCR se realizó en 1 x Tampón GeneAmp® PCR Gold, EDTA 0,25 mM y EGTA 0,125 mM. Se utilizó ADN polimerasa AmpliTaq Gold® a una concentración de 10 unidades/reacción, con los dNTP (dATP, dGTP, dTTP y dCTP) presentes a una concentración final 0,20 mM cada uno. Se utilizó una concentración final de MgCl<sub>2</sub> 8 mM en un volumen de reacción total de 0,1 ml. Los volúmenes de las muestras fueron 50 µl, conteniendo ninguno o 10<sup>1</sup>-10<sup>6</sup> cuerpos elementales de Clamidia (EB)/reacción. Se utilizaron cebadores a una concentración de 200-400 nM cada uno, y las sondas baliza a una concentración 100 nM de cada una. Estuvieron presentes una secuencia diana de control interno (CI) y la sonda de control a una concentración final de 500 copias/reacción y 100 nM respectivamente.

35 Las mezclas de reacción se amplificaron en un termociclador Perkin-Elmer. Las mezclas de reacción se incubaron primero a 95°C durante 9,5 minutos. La amplificación mediante PCR se llevó a cabo después en 45 ciclos siendo cada ciclo a 95°C durante 30 segundos y a continuación a 59°C durante 60 segundos. Después de someter las mezclas de reacción a un ciclo térmico, las mezclas se mantuvieron a 95°C durante 3 minutos y disminuyendo después a 25°C durante 10 minutos para la hibridación de la sonda. Los productos de reacción se detectaron en un lector de fluorescencia de microplacas robótico usando las siguientes emisión máxima y anchuras de banda (en nm):

40

TABLA 3

	1ª Flúor	2ª Flúor	3ª Flúor
Excitación	485/20	534/8	585/8
Emisión	517/8	562/12	612/12

Los datos de este experimento se presentan en la Tabla 4 y muestran la detección del serotipo Ba de CT a concentraciones tan bajas como 10 BB/reacción utilizando el conjunto de cebador/sonda 3.

45

TABLA 4

[CT] (EB/reacción)	Fluorescencia Medida
0	2559
10	10441
100	12451
1000	12760
10.000	14819
1000000	17243

Por lo tanto, este ejemplo muestra la buena respuesta de la diana a lo largo de un intervalo de 10 a 10<sup>6</sup>EB/reacción.

#### Ejemplo 4

##### 5 **Reactividad cruzada entre CT y NG**

10 Para la prueba de reacciones cruzadas entre los conjuntos de cebador/sonda de CT y NG, se combinaron el ADN diana y los conjuntos de cebador/sonda para CT y NG en cada mezcla de reacción para detectar simultáneamente ADN de CT y NG en muestras de ensayo. Los ADN de CT y NG se prepararon como en el Ejemplo 2, y las muestras se prepararon como se indica a continuación. El conjunto de cebador/sonda Núm. 7 de CT (SEQ ID NO: 1 y 4 como cebadores y SEQ ID NO: 7 como sonda) y el conjunto de cebador/sonda Núm. 12 de NG (SEQ ID NO: 8 y 9 como cebadores y SEQ ID NO: 12 como sonda) se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 y se utilizaron juntos o por separado para amplificar y detectar las diluciones de ADN de CT y NG.

15 Las muestras incluyeron 2 paneles de reactividad cruzada (muestras 1-58 y muestras 1B-23B), así como controles negativos (Neg) y positivos (.12 x, 1x y 10x). Cada mezcla de reacción comprendía una concentración final de 0,40 uM de cebador directo de CT (SEQ ID NO: 1), 0,20 uM de cebador inverso de CT (SEQ ID NO: 4), 0,10 uM de sonda baliza de CT (SEQ ID NO: 7), 0,20 uM cebador directo de NG (SEQ ID NO: 8), 0,20 uM de cebador inverso de NG (SEQ ID NO: 9), 0,10 uM de sonda baliza de NG (SEQ ID NO: 12), 5 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq, dNTPs mM, y MgCl<sub>2</sub> 8 mM en 1x Tampón para PCR II. Se sometieron a ciclación reacciones de 100 ul 45 veces a 95°C/30 seg y 59°C/1 min para la amplificación del ADN, seguido de 1 ciclo a 95°C/3 min y 25°C/10 min para la desnaturalización final y el recocido de la sonda.

25 Es importante destacar que la detección de CT no resultó alterada por la inclusión del conjunto de cebador/sonda de NG con el conjunto de cebador/sonda de CT en las mezclas de reacción de CT, permaneciendo la sensibilidad a aproximadamente 10<sup>7</sup> organismos por reacción. Del mismo modo, la detección de NG no resultó alterada por la inclusión del conjunto de cebador/sonda de CT con el conjunto de cebador/sonda de NG en las mezclas de reacción de NG, permaneciendo la sensibilidad a aproximadamente 10<sup>7</sup> organismos por reacción.

30 Los reactivos del ensayo de NG detectaron NG, pero no detectaron ninguna de más de otras 50 cepas no transmitidas sexualmente (no ETS) de Neisseria, ni 3 cepas de Chlamydia (trachomatis, pneumoniae y psittaci).

#### Ejemplo 5 (Comparativo)

##### 35 **Detección de la Serovariedad de CT**

Para determinar si y con qué sensibilidad los cebadores y sondas de la invención podrían detectar un intervalo de serovariedades de CT, se sometió a ensayo un panel de dilución de 15 serotipos de CT en reacciones que incluían conjuntos de cebador/sonda para CT y NG, y muestras de control negativas (Neg) y positivas (1x y 12x) adecuadas. El conjunto de cebador/sonda Núm. 7 de CT y el conjunto de cebador/sonda Núm. 12 de NG se prepararon como se describe en el Ejemplo 1, y los ADN de control de CT y NG se prepararon como en el Ejemplo 2.

45 Las muestras de las serovariedades de CT estuvieron presentes en las mezclas de reacción a concentraciones finales en el intervalo de 10-1000 moléculas por reacción. Cada mezcla de reacción comprendía una concentración final 0,40 uM de cebador directo de CT (SEQ ID NO: 1), 0,20 uM de cebador inverso de CT (SEQ ID NO: 4), 0,10 uM de sonda baliza de CT (SEQ ID NO: 7), 0,45 uM de cebador directo de NG (SEQ ID NO: 8), 0,25 uM de cebador inverso de NG (SEQ ID NO: 9), 0,10 uM de sonda baliza de NG (SEQ ID NO: 12), 3 unidades de DNA polimerasa AmpliTaq, dNTPs 1 mM, y MgCl<sub>2</sub> 8 mM en 1x Tampón de PCR II. Se sometieron a ciclación reacciones de 100 ul 45 veces a 95°C/30 seg y 59°C/1 min para la amplificación del ADN, seguido por 1 ciclo a 95°C/3 min y 25°C/10 min para la desnaturalización final y el recocido de la sonda.

Se detectaron dieciséis serovariedades de Chlamydia trachomatis utilizando los conjuntos de cebador/sonda de la presente invención a lo largo de las concentraciones de 10-1000 copias por reacción.

#### 55 **Ejemplo 6**

##### **Defección del auxotipo de NG**

60 Para determinar si y con qué sensibilidad los cebadores y sondas de la invención podrían detectar un intervalo de subtipos de NG, se sometió a ensayo un panel de dilución de 7 auxotipos de NG en las reacciones que incluían los conjuntos de cebador/sonda para CT y NG, y muestras de control negativas (Neg) y positivas (1x y .12x) adecuadas. El conjunto de cebador/sonda Núm. 7 de CT y el conjunto de cebador/sonda Núm. 12 de NG se prepararon como se describe en el Ejemplo 1, y los ADN de control de CT y NG se prepararon como en el Ejemplo 2.

5 Las muestras del auxotipo de NG estuvieron presentes en las mezclas de reacción a concentraciones finales en el intervalo de 10-1000 moléculas por reacción. Cada mezcla de reacción comprendía una concentración final de 0,40 uM de cebador directo de CT (SEQ ID NO: 1), 0,20 uM de cebador inverso de CT (SEQ ID NO: 4), 0,10 uM sonda baliza de CT (SEQ ID NO: 7), 0,20 uM de cebador directo de NG (SEQ ID NO: 8), 0,20 uM de cebador inverso de NG (SEQ ID NO: 9), 0,10 uM sonda baliza de NG (SEQ ID NO: 12), 3 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq, dNTPs 1 mM, y MgCl<sub>2</sub> 8 mM en Tampón 1x PCR II. La reacciones se sometieron a ciclación 45 veces a 95°C/30 seg y 59°C/1 min para la amplificación del ADN, seguido por 1 ciclo a 95°C/3 min y 25°C/10 min para la desnaturalización final y el recocido de la sonda.

10 Se sometieron a ensayo 6 auxotipos de NG, y todos los auxotipos sometidos a ensayo se detectaron con alta sensibilidad (10 copias por reacción), utilizando los conjuntos de cebador/sonda de la invención. Además, no se observó reactividad cruzada con el conjunto de cebador de CT incluso cuando estaba presente NG a una alta concentración (10<sup>7</sup> moléculas de NG por reacción).

15 **LISTA DE SECUENCIAS**

<110> Abbott Laboratories  
 Pabish, Edward K.  
 Marshall, Ron L.  
 20 Yu, Hong  
 <120> Polinucleótidos para la amplificación y detección de Chlamidia Trachomatis y Neisseria Gonorrhoeae  
 <130> 6873WO01  
 <140> Todavía No Asignado  
 <141> 2003-11-07  
 25 <150> 10/292,420  
 <151> 2002-11-12  
 <160> 12  
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0  
 <210> 1  
 30 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador Directo de CT  
 35 <400> 1  
 gggattcctg taacaa caag tcagg 25  
 <210> 2  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador Directo de CT Preferido  
 <221> rasgo\_misc  
 <222> (8) ... 18)  
 45 <223> d = a o q o t/u en la posición 8  
 <400> 2  
 gggattcdtg taacaacaag tcagg 25  
 <210> 3  
 <211> 25  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador Directo de CT Más Preferido  
 <400> 3  
 55 gggattcgtg taacaacaag tcagg 25  
 <210> 4  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador Inverso de CT  
 <400> 4  
 gcttgcacga agtactctag gag 23  
 <210> 5

<211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 5 <223> Sonda de CT <400> 5  
 atagcactat agaactctgc aa 22  
 <210> 6  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de CT Alternativa  
 <400> 6  
 catagcacta tagaactctg caagcc 26  
 15 <210> 7  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 20 <223> Sonda Baliza de CT  
 <400> 7  
 ctggcatagc actatagaac tctgcaagcc ag 32  
 <210> 8  
 <211> 20  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador Directo de NG  
 <400> 8  
 30 cgacqtaccq gttttgttc 20  
 <210> 9  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Cabador Inverso de NG  
 <400> 9  
 cggctccta ttcggttga cc 22  
 <210> 10  
 40 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de NG  
 45 <400> 10  
 acaccgcccg gaaccoga 18  
 <210> 11  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de NG Alternativa  
 <400> 11  
 gaaacaccgc cgggaaccg at 22  
 55 <210> 12  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 60 <223> Sonda Baliza de NG  
 <400> 12  
 ctggacacc gcccggaacc cgag 24



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una combinación de reactivos polinucleotídicos que comprende polinucleótidos que consisten en las secuencias del SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10.
- 10 2. Un método para amplificar una muestra de ensayo de *Neisseria gonorrhoeae* comprendiendo dicho método:  
(a) formar una mezcla de reacción que comprende reactivos de amplificación de ácidos nucleicos, una muestra de ensayo que contiene potencialmente una secuencia diana *Neisseria gonorrhoeae*, y una combinación según la reivindicación 1; y  
(b) someter la mezcla a condiciones de amplificación para generar al menos una copia de una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, en el que las condiciones de amplificación incluyen cambiar la temperatura de la muestra y el cambio de temperatura se repite entre 10 y 100 veces.
- 20 4. Un método de detección de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra de ensayo, comprendiendo dicho método:  
(a) formar una mezcla de reacción que comprende reactivos de la reacción de amplificación de ácidos nucleicos, una muestra de ensayo que contiene potencialmente una secuencia diana de *Neisseria gonorrhoeae*, y al menos una combinación de acuerdo con la reivindicación 1;  
(b) someter la mezcla a condiciones de amplificación para generar al menos una copia de una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana;  
(c) hibridar la sonda a la secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana, para formar un híbrido que comprende la sonda y la secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana; y  
(d) detectar el híbrido como una indicación de la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* en la muestra de ensayo.
- 25 5. Un kit que comprende:  
(a) al menos tres secuencias que comprenden polinucleótidos que consisten en el SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10, y  
(b) reactivos de amplificación.
- 30 6. La combinación de reactivos polinucleotídicos de la reivindicación 1, en la que uno o más de los polinucleótidos incorporan uno o más marcas detectables.
- 35 7. El kit de la reivindicación 5, donde uno o más de los polinucleótidos incorporan una o más marcas detectables.