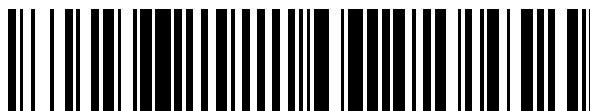


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 925**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2003** **E 03741986 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013** **EP 1552022**

54 Título: **Identificación de oligonucleótidos para la captura, detección y cuantificación de ácidos nucleicos del virus de la hepatitis A**

30 Prioridad:

12.06.2002 US 388544 P

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

10.05.2013

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.
(100.0%)
4560 HORTON STREET
EMERYVILLE, CA 94608, US**

72 Inventor/es:

SHYAMALA, VENKATAKRISHNA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 402 925 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

Identificación de oligonucleótidos para la captura, detección y cuantificación de ácidos nucleicos del virus de la hepatitis A.

Campo técnico

La presente invención pertenece en general a los ensayos diagnósticos para virus. En concreto, la invención se refiere a ensayos basados en ácidos nucleicos para diagnosticar con precisión la infección por hepatitis A y detectar la hepatitis A en una muestra biológica.

Antecedentes de la invención

La hepatitis A es una enfermedad de transmisión entérica que causa fiebre, malestar, anorexia, náuseas, molestia abdominal e ictericia. El agente etiológico de la hepatitis A, el virus de la hepatitis A, es un pequeño virus esférico sin envoltura, clasificado en el género Hepatovirus de la familia *Picornaviridae*. El genoma de VHA consiste en una molécula de ARN lineal de una sola hebra, de 7,5 kb, que codifica un precursor de poliproteínas que se procesa para producir las proteínas estructurales y las actividades enzimáticas necesarias para la replicación vírica (Najarian *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82:2627-2632 (1985)). El VHA crece mal en cultivo celular, no es citopático, y produce bajos rendimientos de virus. Aunque el ARN de VHA extraído de viriones es infeccioso en cultivo celular (Locarnini *et al.*, J. Virol. 37:216-225 (1981) y Siegl *et al.*, J. Gen. Virol. 57:331-341 (1981)), la manipulación directa del genoma viral se vuelve difícil debido a su composición de ARN.

El VHA codifica cuatro proteínas de la cápside (A, B, C y D) que contienen los dominios antigénicos principales reconocidos por los anticuerpos de los individuos infectados. Además de las proteínas de la cápside, se han descrito dominios antigénicos en proteínas no estructurales tales como la 2A y la proteasa codificada vírica. Se ha descrito otro dominio antigénico de VHA importante en el punto de unión entre el precursor de la cápside P1 y 2A.

El VHA se adquiere normalmente por la vía fecal-oral, por contacto de persona a persona o por ingestión de agua o alimentos contaminados. Sin embargo, existe el potencial para la transmisión del VHA por productos de plasma combinado. La ausencia de una envoltura lipídica hace al VHA muy resistente a la inactivación fisicoquímica, y el virus puede soportar un tratamiento térmico convencional de los productos sanguíneos. Por lo tanto, el VHA, así como el parvovirus B19, se ha transmitido a través de la administración de derivados de plasma combinado. El desarrollo de ensayos de diagnóstico sensibles y específicos para identificar anticuerpos y/o antígenos de la hepatitis A en los individuos infectados, así como ensayos basados en ácidos nucleicos para detectar muestras virémicas para excluirlas de la transfusión representa un desafío importante para la salud pública.

La patente de EE.UU. Nº 5.290.677 de Robertson *et al.*, describe la captura del virus VHA entero utilizando anticuerpos. Se aísla el ARN y se genera el ADNc. A continuación se amplifica el ADNc mediante PCR utilizando los cebadores de la región de la cápside VP1 y VP3 del genoma de VHA, y se detecta el producto amplificado utilizando sondas de la misma región del genoma. La selección de los cebadores y las sondas se basa en el genotipo del VHA a detectar.

Sigue existiendo la necesidad de desarrollar ensayos de diagnóstico fiables para detectar el virus de la hepatitis A en muestras virémicas, con el fin de evitar la transmisión del virus a través de derivados sanguíneos y del plasma o mediante el contacto personal estrecho.

Resumen de la invención

La presente invención se basa en el desarrollo de un ensayo de diagnóstico basado en ácidos nucleicos, sensible y fiable, para la detección del VHA en muestras biológicas de individuos potencialmente infectados. Las técnicas descritas en el presente documento utilizan ácido nucleico extraído de la muestra como molde para la amplificación de regiones conservadas del genoma de la secuencia VHA utilizando PCR, amplificación mediada por transcripción (TMA), así como en un ensayo de 5'-nucleasa, tal como la técnica TaqMan™. Los métodos permiten la detección del VHA en muestras virémicas. En determinadas formas de realización, la presente invención utiliza cebadores y sondas derivadas de la región 5' UTR del genoma de VHA. Además, los métodos permiten un análisis en un único recipiente ("one-pot") en el que los ácidos nucleicos de la muestra capturados pueden someterse a amplificación y detección en el mismo recipiente. Utilizando los métodos de la invención, las muestras infectadas pueden identificarse y excluirse de la transfusión, así como de la preparación de derivados sanguíneos.

Por consiguiente, en una forma de realización, la presente invención se refiere a un método para detectar la infección por VHA en una muestra biológica. El método comprende:

aislar los ácidos nucleicos de una muestra biológica de la que se sospecha que contiene el VHA, en la que los ácidos nucleicos se aíslan de la muestra biológica mediante un método que comprende:

aislar ácidos nucleicos de una muestra biológica de la que sospecha que contiene el VHA, en la que los ácidos nucleicos se aíslan de la muestra biológica mediante un método que comprende:

- 5 i. poner en contacto un soporte sólido que comprende ácidos nucleicos de captura asociados con el mismo con una muestra biológica en condiciones de hibridación en las que las hebras de ácido nucleico diana hibridan con los ácidos nucleicos de captura; y
- 10 ii. separar el soporte sólido de la muestra, y en el que los ácidos nucleicos de captura comprenden uno o más oligonucleótidos, en el que cada uno de los oligonucleótidos tiene una longitud no superior a aproximadamente 60 nucleótidos y comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:10, la SEQ ID NO:11, la SEQ ID NO:12, la SEQ ID NO:13 y la SEQ ID NO:14;
- 15 en el que el soporte sólido que comprende perlas;
- 20 amplificar los ácidos nucleicos aislados utilizando al menos dos cebadores derivados de la 5' UTR del genoma de VHA,
- 25 en el que cada uno de los cebadores tienen una longitud de 10 a 60 nucleótidos y es suficientemente complementario a una porción de las hebras codificante y no codificante, respectivamente, del ácido nucleico aislado para hibridar con las mismas,
- 30 y en el que
- 35 (a) uno de los cebadores comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:1 y el otro cebador comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:2, o
- 40 (b) los cebadores tienen un 90% de identidad de secuencia con las secuencias de nucleótidos descritas en (a); y
- 45 detectar la presencia de los ácidos nucleicos amplificados como indicio de la presencia o ausencia de VHA en la muestra.
- 50 En determinadas formas de realización, las perlas son perlas magnéticas.
- 55 En determinadas formas de realización, el aislamiento, la amplificación y la detección se realizan en un único recipiente.
- 60 Preferentemente, los ácidos nucleicos de captura comprenden adicionalmente una cadena de homopolímero en el extremo 3' o en el 5' de aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud, en el que la cadena de homopolímero está seleccionada del grupo que consiste en poliA, poliT, poliG, poliC, y poliU.
- 65 Más preferentemente, la cadena de homopolímero es una cadena de poliA.
- 70 En determinadas formas de realización, la amplificación comprende PCR, amplificación mediada por transcripción (TMA) o Taq-Man.
- 75 Preferentemente la amplificación comprende TMA.
- 80 Preferentemente, dichos métodos de amplificación, comprenden adicionalmente el uso de un oligonucleótido sonda que comprende un marcador detectable para detectar la secuencia amplificada, en el que el oligonucleótido sonda tiene una longitud no superior a aproximadamente 60 nucleótidos y comprende al menos 10 nucleótidos contiguos que comprenden la SEQ ID NO:3.
- 85 Preferentemente, la sonda comprende marcadores detectables en el extremo 5' y en el extremo 3'.
- 90 Preferentemente, el marcador detectable es un marcador fluorescente seleccionado del grupo que consiste en 6-carboxifluoresceína (6-FAM), tetrametil rodamina (TAMRA), y 2',4',5',7',-tetracloro-4-7-diclorofluoresceína (TET).
- 95 En una forma de realización adicional, la invención se refiere a un kit para detectar una infección por el virus de la hepatitis A (VHA) en una muestra biológica, comprendiendo el kit:
- 100 capturar los ácidos nucleicos que comprenden uno o más oligonucleótidos, en el que cada uno de los oligonucleótidos tiene una longitud no superior a aproximadamente 60 nucleótidos y comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:10, la SEQ ID NO:11, la SEQ ID NO:12, la SEQ ID NO:13 y la SEQ ID NO:14;
- 105 al menos dos cebadores en los que (a) cada uno de los cebadores tiene una longitud no superior a aproximadamente 60 nucleótidos y un cebador comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:1 y el otro cebador comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:2;

instrucciones escritas para identificar la infección por VHA; y
un soporte sólido que comprende perlas.

Preferentemente, el kit comprende adicionalmente una polimerasa y tampones.

Preferentemente, el kit comprende adicionalmente un oligonucleótido sonda de no más de aproximadamente 60 nucleótidos de longitud y al menos 10 nucleótidos contiguos que comprenden la SEQ ID NO:3.

Preferentemente la sonda comprende adicionalmente marcadores detectables en el extremo 5' y en el extremo 3'.

Preferentemente, el marcador detectable es un marcador fluorescente seleccionado del grupo que consiste en 6-carboxifluoresceína (6-FAM), tetrametil rodamina (TAMRA), y 2',4',5',7',-tetracloro-4-7-diclorofluoresceína (TET).

Estos y otros aspectos de la presente invención se harán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada y a los dibujos adjuntos. Además, en el presente documento se exponen diversas referencias que describen con más detalle determinados procedimientos o composiciones.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1B (SEQ ID NOS: 1 y 2) representan cebadores ejemplares utilizados en la amplificación de los ácidos nucleicos de VHA aislados.

La Figura 2 (SEQ ID NO:3) representa una sonda utilizada para detectar la presencia de los oligonucleótidos diana amplificados que indican la presencia del VHA, donde X es 6-FAM (fluoresceína), y Z es un conector más TAMRA (tetrametilrodamina).

Las Figuras 3A-3F (SEQ ID NOS :10-15), representan oligonucleótidos de captura ejemplares para aislar los ácidos nucleicos de VHA de una muestra biológica.

La Figura 4A representa una secuencia diana de tipo silvestre de VHA (SEQ ID NO:16). La figura 4B (SEQ ID NO:17) representa una secuencia testigo interna ejemplar utilizada como testigo para la captura y amplificación de la diana. Las bases en negrita representan la secuencia en el tipo silvestre que está sustituida en la secuencia testigo interna.

Descripción detallada de la invención

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, los métodos de química, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y virología convencionales, dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas están explicadas con todo detalle en la literatura. Véanse, por ejemplo, Fundamental Virology, 2ª edición, vol. I y II (B.N. Fields y DM Knipe, eds.); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., edición actual); Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª edición, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed, 1984.); A Practical Guide to Molecular Cloning (1984).

Debe señalarse que, tal como se utilizan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un oligonucleótido" incluye una mezcla de dos o más oligonucleótidos, y similares.

A lo largo de todo el texto se utilizan las siguientes abreviaturas de aminoácidos:

Alanina: Ala (A)	Arginina: Arg (R)
Asparagina: Asn (N)	Ácido aspártico: Asp (D)
Cisteína: Cys (C)	Glutamina: Gln (Q)
Ácido glutámico: Glu (E)	Glicina: Gly (G)
Histidina: His (H)	Isoleucina: Ile (I)
Leucina: Leu (L)	Lisina: Lys (K)
Metionina: Met (M)	Fenilalanina: Phe (F)
Prolina: Pro (P)	Serina: Ser (S)
Treonina: Thr (T)	Triptófano: Trp (W)
Tirosina: Tyr (Y)	Valina: Val (V)

I. Definiciones

En la descripción de la presente invención, se emplearán los siguientes términos y expresiones, y pretenden ser definidos como se indica a continuación.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se refieren a un polímero de restos de aminoácidos y no están limitados a una longitud mínima del producto. Por lo tanto, dentro de la definición se incluyen péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros, y similares. Las proteínas de longitud completa y fragmentos de las mismas quedan abarcados por la definición. Los términos también incluyen modificaciones después de la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, para los fines de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), con respecto a la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de hospedadores que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación mediante PCR.

Por "aislado" se entiende, cuando se hace referencia a un polipéptido, que la molécula indicada está separada del organismo entero con el que la molécula se encuentra en la naturaleza o está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término "aislado" con respecto a un polinucleótido es una molécula de ácido nucleico desprovista, en su totalidad o en parte, de las secuencias normalmente asociadas con ella en la naturaleza; o una secuencia, tal como existe en la naturaleza, pero que tiene secuencias heterólogas en asociación con la misma; o una molécula disociada del cromosoma.

Un polinucleótido "derivado de" o "específico para" una secuencia indicada se refiere a una secuencia de polinucleótido que comprende una secuencia contigua de aproximadamente al menos unos 6 nucleótidos, preferentemente al menos aproximadamente 8 nucleótidos, más preferentemente al menos aproximadamente 10-12 nucleótidos, e incluso más preferentemente al menos aproximadamente 15-20 nucleótidos correspondiente, es decir, idéntica o complementaria a, una región de la secuencia de nucleótidos indicada. El polinucleótido derivado no derivará necesariamente físicamente de la secuencia de nucleótidos de interés, pero puede generarse de cualquier manera, incluyendo, pero sin limitarse a, síntesis química, replicación, transcripción inversa o transcripción, que se basa en la información proporcionada por la secuencia de bases en la región o regiones de las que deriva el polinucleótido. Como tal, esto puede representar una orientación codificante o no codificante del polinucleótido original.

"Homología" se refiere al porcentaje de similitud entre dos restos de polinucleótido o dos de polipéptido. Dos secuencias de ácido nucleico o dos de polipéptido son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando las secuencias presentan al menos aproximadamente un 50%, preferentemente al menos aproximadamente un 75%, más preferentemente al menos aproximadamente un 80%-85%, preferentemente al menos aproximadamente un 90%, y lo más preferentemente al menos aproximadamente un 95%-98% de similitud de secuencia en una longitud definida de las moléculas. Tal como se utiliza en el presente documento, sustancialmente homólogas se refiere también a secuencias que muestran una identidad completa con la secuencia de ácido nucleico o de polipéptido especificada.

En general, "identidad" se refiere a una correspondencia exacta nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de dos polinucleótidos o secuencias polipeptídicas, respectivamente. El porcentaje de identidad puede determinarse mediante una comparación directa de la información de la secuencia entre dos moléculas alineando las secuencias, contando el número exacto de coincidencias entre las dos secuencias alineadas, dividiendo por la longitud de la secuencia más corta, y multiplicando el resultado por 100.

Pueden utilizarse programas informáticos fácilmente disponibles para ayudar en el análisis de homología e identidad, tales como ALIGN, Dayhoff, M.O. en Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff ed., 5 Supl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Advances in Appl. Math. 2:482-489, 1981 para el análisis de péptidos. Se dispone de programas para determinar la homología de la secuencia de nucleótidos en el Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 (disponible en Genetics Computer Group, Madison, WI) por ejemplo, los programas BESTFIT, FASTA y GAP, que también se basan en el algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas son fácilmente utilizados con los parámetros por defecto recomendados por el fabricante y descritos en el Wisconsin Sequence Analysis Package mencionado anteriormente. Por ejemplo, puede determinarse el porcentaje de homología de una secuencia de nucleótidos concreta respecto a una secuencia de referencia utilizando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuación por defecto y una penalización por hueco de seis posiciones de nucleótidos.

Otro método para establecer el porcentaje de homología en el contexto de la presente invención es utilizar el paquete de programas MPSRCH con derechos de autor de la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrock, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). A partir de esta serie de paquetes puede emplearse el algoritmo de Smith-Waterman en el que se utilizan los parámetros por defecto para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización por apertura de hueco de 12, penalización por extensión de hueco de uno, y un hueco de seis). A partir de los datos generados el valor "Match" ("correspondencia") refleja la "homología de secuencia". En la técnica se conocen generalmente otros programas adecuados para calcular la similitud o porcentaje de identidad entre secuencias, por ejemplo, otro programa de alineación es BLAST, utilizado con parámetros por defecto. Por ejemplo, pueden utilizarse BLASTN y BLASTP utilizando los siguientes parámetros por defecto: código genético = patrón; filtro = ninguno; hebra = ambas; punto de corte = 60; esperado = 10; matriz = BLOSUM62; descripciones = 50 secuencias; ordenado por = HIGH SCORE; bases de datos = no

redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traducciones de CDS de GenBank + Swiss protein + Spupdate + PIR. Los detalles de estos programas pueden encontrarse en la siguiente dirección de Internet: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

Como alternativa, puede determinarse la homología por hibridación de polinucleótidos en condiciones que formen dúplex estables entre regiones homólogas, seguido de digestión con nucleasa(s) específica(s) de la forma monocatenaria, y la determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Las secuencias de ácidos nucleicos que son sustancialmente homólogas pueden identificarse en un experimento de hibridación Southern, por ejemplo, en condiciones rigurosas, tal como se define para ese sistema concreto. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas está dentro de los conocimientos de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*; DNA Cloning, *supra*; Nucleic Acid Hybridization, *supra*.

"Recombinante" tal como se utiliza en el presente documento para describir una molécula de ácido nucleico se refiere a un polinucleótido de origen genómico, ADNc, de origen viral, semisintético o sintético que, en virtud de su origen o manipulación no está asociado con todo o una porción del polinucleótido con el que está asociada en la naturaleza. El término "recombinante" tal como se utiliza con respecto a una proteína o polipéptido se refiere a un polipéptido producido por expresión de un polinucleótido recombinante. En general, el gen de interés se clona y a continuación se expresa en organismos transformados, tal como se describe más adelante. El organismo hospedador expresa el gen extraño para producir la proteína en condiciones de expresión.

Un "elemento testigo" se refiere a una secuencia de polinucleótido que ayuda en la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos a la que está enlazada. La expresión incluye promotores, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores cadena arriba, señales de poliadenilación, regiones no traducidas, incluyendo las 5' UTR y 3' UTR y cuando resulte apropiado, secuencias líder y potenciadores, que proporcionan colectivamente la transcripción y la traducción de una secuencia codificante en una célula hospedadora.

Un "promotor", tal como se utiliza en el presente documento es una región reguladora capaz de unirse a una polimerasa e iniciar la transcripción de una secuencia de nucleótidos cadena abajo (dirección 3') enlazada operativamente a la misma. Para los fines de la presente invención, una secuencia de promotor incluye el número mínimo de bases o elementos necesario para iniciar la transcripción de una secuencia de interés a niveles detectables por encima del nivel de fondo. Dentro de la secuencia de promotor hay un sitio de iniciación de la transcripción, así como dominios de unión a proteínas (secuencias de consenso) responsables de la unión de la ARN o la ADN polimerasa. Por ejemplo, el promotor puede ser una secuencia de ácidos nucleicos que es reconocida por una ARN polimerasa dependiente de ADN ("transcriptasa") como señal para unirse al ácido nucleico y comenzar la transcripción del ARN en un sitio específico. Para la unión, tales transcriptasas necesitan generalmente ADN que sea bicatenario en la porción que comprende la secuencia de promotor y su complemento; la parte de molde (secuencia a transcribir) no necesita ser bicatenaria. Las ARN polimerasas dependientes de ADN Individuales reconocen una variedad de secuencias de promotor diferentes que pueden variar notablemente en su eficacia en la promoción de la transcripción. Cuando una ARN polimerasa se une a una secuencia de promotor para iniciar la transcripción, esa secuencia de promotor no es parte de la secuencia transcrita. Por lo tanto, los transcritos de ARN producidos de este modo no incluirán esa secuencia.

Una secuencia testigo "dirige la transcripción" de una secuencia de nucleótidos cuando la ARN o ADN polimerasa se une a la secuencia de promotor y transcribe la secuencia adyacente.

Una "ADN polimerasa dependiente de ADN" es una enzima que sintetiza una copia de ADN complementario a partir de un molde de ADN. Son ejemplos la ADN polimerasa I de *E. coli* y la ADN polimerasa del bacteriófago T7. Todas las ADN polimerasas dependientes de ADN conocidas necesitan un cebador complementario para iniciar la síntesis. En condiciones adecuadas, una ADN polimerasa dependiente de ADN puede sintetizar una copia de ADN complementaria a partir de un molde de ARN.

Una "ARN polimerasa dependiente de ADN" o un "transcriptasa" es una enzima que sintetiza múltiples copias de ARN a partir de una molécula de ADN bicatenario o parcialmente bicatenario que tiene una secuencia de promotor (generalmente bicatenaria). Las moléculas de ARN ("transcritos") se sintetizan en la dirección 5' a 3' comenzando en una posición específica justo cadena abajo del promotor. Son ejemplos de transcriptasas la ARN polimerasa dependiente de ADN de *E. coli* y de los bacteriófagos T7, T3 y SP6.

Un "ADN polimerasa dependiente de ARN" o "transcriptasa inversa" es una enzima que sintetiza una copia de ADN complementario a partir de un molde de ARN. Todas las transcriptasas inversas conocidas también tienen la capacidad de hacer una copia de ADN complementario a partir de un molde de ADN; por lo tanto, ambas son ADN polimerasas dependientes de ARN y ADN. Para iniciar la síntesis con el molde de ARN y el de ADN se necesita un cebador.

La "ARNasa H" es una enzima que degrada la porción de ARN de un dúplex ARN:ADN. Estas enzimas pueden ser endonucleasas o exonucleasas. La mayoría de las enzimas transcriptasas inversas contienen normalmente actividad ARNasa H además de su actividad polimerasa. Sin embargo, se dispone de otras fuentes de la ARNasa H sin

actividad polimerasa asociada. La degradación puede dar como resultado la separación del ARN a partir de un complejo ARN:ADN. Como alternativa, la ARNasa H puede cortar simplemente el ARN en diversos lugares de manera que se desnaturalicen porciones del ARN o puede permitir que las enzimas desenrollen porciones del ARN.

Los términos y expresiones "polinucleótido", "oligonucleótido", "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" se utilizan en el presente documento para incluir una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Este término se refiere solamente a la estructura primaria de la molécula. Por lo tanto, el término incluye ADN monocatenario, bicatenario y tricatenario, así como ARN monocatenario, bicatenario y tricatenario. También incluye modificaciones, tales como por metilación y/o por protección terminal, y formas no modificadas del polinucleótido. Más concretamente, los términos y expresiones "polinucleótido", "oligonucleótido", "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" incluyen polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa), cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un N- o C-glucósido de una base de purina o pirimidina, y otros polímeros que contienen estructuras no nucleotídicas, por ejemplo, polímeros poliamida (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos (PNA)) y polimorfolino (disponible en el mercado en Anti-Virals, Inc., Corvallis, Oregon, como Neugene), y otros polímeros de ácidos nucleicos específicos de secuencia sintéticos siempre que los polímeros contengan bases nitrogenadas en una configuración que permita el apareamiento de bases y el apilamiento de bases, tal como se encuentra en el ADN y ARN. No se pretende una distinción de longitud entre los términos y expresiones "polinucleótido", "oligonucleótido", "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico", y estos términos y expresiones se utilizarán indistintamente. Estos términos y expresiones se refieren solamente a la estructura primaria de la molécula. Por lo tanto, estos términos y expresiones incluyen, por ejemplo, 3'-desoxi-2',5'-ADN, fosforamidados N3' P5' de oligodesoxirribonucleótidos, ARN sustituido con 2'-O-alkilo, ADN monocatenario y bicatenario, así como ARN monocatenario y bicatenario, híbridos ADN:ARN, e híbridos entre PNA y ADN o ARN, y también incluyen tipos conocidos de modificaciones, por ejemplo, marcadores que son conocidos en la técnica, metilación, "protecciones terminales", sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleótido tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces sin carga (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidados, carbamatos, etc.), con enlaces cargados negativamente (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), y con enlaces cargados positivamente (por ejemplo, aminoalquilfosforamidados, aminoalquilfosfotriésteres), aquellas que contienen restos pendientes, tales como, por ejemplo, proteínas (incluyendo nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellas con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellas que contienen alquilantes, aquellas con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anómicos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido u oligonucleótido. En concreto, el ADN es ácido desoxirribonucleico.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "región del ácido nucleico diana" o "ácido nucleico diana" se refiere a una molécula de ácido nucleico con una "secuencia diana" a amplificar. El ácido nucleico diana puede ser monocatenario o bicatenario y puede incluir otras secuencias además de la secuencia diana, que pueden no amplificarse. La expresión "secuencia diana" se refiere a la secuencia de nucleótidos concreta del ácido nucleico diana que se va a amplificar. La secuencia diana puede incluir una región de hibridación para la sonda contenida dentro de la molécula diana con la que una sonda formará un híbrido estable en las condiciones deseadas. La "secuencia diana" también puede incluir las secuencias formadoras de complejos con las que los cebadores oligonucleótidos forman complejos y prolongarse utilizando la secuencia diana como molde. Cuando el ácido nucleico diana es originalmente monocatenario, la expresión "secuencia diana" se refiere también a la secuencia complementaria a la "secuencia diana" tal como está presente en el ácido nucleico diana. Si el "ácido nucleico diana" es originalmente bicatenario, la expresión "secuencia diana" se refiere a la hebra codificante (+) y a la no codificante (-).

El término "cebador" o la expresión "cebador oligonucleótido" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido que actúa para iniciar la síntesis de una hebra complementaria de ácido nucleico cuando se pone en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de prolongación de cebador, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor de la polimerización tal como una ADN o ARN polimerasa y a temperatura, pH, concentración de metales y concentración salina adecuados. El cebador es preferentemente monocatenario para una máxima eficacia en la amplificación, pero puede ser bicatenario. Si es bicatenario, el cebador se trata primero para separar sus hebras antes de ser utilizado para preparar los productos de prolongación. Esta etapa de desnaturalización se efectúa por lo general mediante calor, pero puede llevarse a cabo utilizando álcali, seguido de neutralización. Por lo tanto, un "cebador" es complementario a un molde, y forma complejos mediante enlaces de hidrógeno o hibridación con el molde para dar un complejo cebador/molde para la iniciación de la síntesis mediante una polimerasa, que se prolonga mediante adición de bases unidas covalentemente, enlazadas en su extremo 3' complementario al molde en el proceso de síntesis de ADN.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sonda" o la expresión "sonda oligonucleótido" se refiere a una estructura comprendida por un polinucleótido, tal como se ha definido anteriormente, que contiene una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a una secuencia de ácidos nucleicos presente en el analito de ácido nucleico diana. Las regiones de polinucleótido de las sondas pueden estar compuestas de ADN, y/o ARN, y/o análogos sintéticos de nucleótidos. Cuando se va a utilizar una "sonda oligonucleótido" en un ensayo de 5'-nucleasa, tal como la técnica TaqMan™, la sonda contendrá al menos un agente fluorescente y al menos un extintor de

fluorescencia que es digerido por la actividad 5'-endonucleasa de una polimerasa utilizada en la reacción con el fin de detectar cualquier secuencia de oligonucleótido diana amplificada. En este contexto, la sonda oligonucleótido tendrá un número suficiente de enlaces fosfodiéster adyacentes a su extremo 5' para que la actividad 5' a 3'-nucleasa empleada pueda degradar de manera eficaz la sonda unida para separar los agentes fluorescentes y los extintores de fluorescencia. Cuando se utiliza una sonda oligonucleótido en la técnica de TMA, se marcará convenientemente, tal como se describe más adelante.

Se entenderá que las secuencias de hibridación no necesitan tener complementariedad perfecta para proporcionar híbridos estables. En muchas situaciones, se formarán híbridos estables cuando haya un desapareamiento de menos de aproximadamente un 10% de las bases, ignorando los bucles de cuatro o más nucleótidos. En consecuencia, tal como se utiliza en el presente documento el término "complementario" se refiere a un oligonucleótido que forma un dúplex estable con su "complemento" en condiciones de ensayo, generalmente cuando haya aproximadamente un 90% o más de homología.

Los términos "hibridar" e "hibridación" se refieren a la formación de complejos entre las secuencias de nucleótidos que son suficientemente complementarias para formar complejos a través de apareamiento de bases de Watson-Crick. Cuando un cebador "hibrida" con la diana (molde), tales complejos (o híbridos) son suficientemente estables para servir para la función de cebado que necesita, por ejemplo, la ADN polimerasa para iniciar la síntesis de ADN.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "par de unión" se refiere a unas moléculas primera y segunda que se unen específicamente entre sí, tales como los pares de polinucleótidos complementarios capaces de formar dúplex de ácidos nucleicos. La "unión específica" del primer miembro del par de unión al segundo miembro del par de unión en una muestra se manifiesta por la unión del primer miembro al segundo miembro, o viceversa, con mayor afinidad y especificidad que a otros componentes de la muestra. La unión entre los miembros del par de unión es por lo general no covalente. A menos que el contexto indique claramente lo contrario, las expresiones "molécula de afinidad" y "analito diana" se emplean en el presente documento para referirse a los miembros primero y segundo de un par de unión, respectivamente.

Las expresiones "molécula de unión específica" y "molécula de afinidad" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a una molécula que se unirá selectivamente, a través de medios químicos o físicos, a una sustancia detectable presente en una muestra. Por "se unen selectivamente" se entiende que la molécula se une preferentemente a la diana de interés o se une con mayor afinidad a la diana que a otras moléculas. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico se une a una secuencia sustancialmente complementaria y no a secuencias no relacionadas.

La "temperatura de fusión" o " T_m " de la molécula de ácido nucleico bicatenario se define como la temperatura a la que se pierde la mitad de la estructura helicoidal del ácido nucleico debido al calentamiento u otra disociación de los enlaces de hidrógeno entre pares de bases, por ejemplo, por tratamiento con ácido o álcali, o similar. La T_m de una molécula de ácido nucleico depende de su longitud y de su composición de bases. Las moléculas de ácidos nucleicos ricas en pares de bases GC tienen una mayor T_m que las que tienen abundancia de pares de bases AT. Las hebras complementarias separadas de ácidos nucleicos se reasocian o hibridan espontáneamente para formar ácidos nucleicos dúplex cuando se baja la temperatura por debajo de la T_m . La mayor velocidad de hibridación de ácidos nucleicos se produce aproximadamente 25°C por debajo de la T_m . La T_m puede estimarse utilizando la siguiente relación: $T_m = 69,3 + 0,41 (\text{GC})\%$ (Marmur *et al.*, (1962) J. Mol. Biol. 5: 109-118).

Tal como se utiliza en el presente documento, una "muestra biológica" se refiere a una muestra de tejido o fluido aislada de un sujeto, que incluye comúnmente anticuerpos producidos por el sujeto. Las muestras típicas incluyen, pero no se limitan a, sangre, plasma, suero, materia fecal, orina, médula ósea, bilis, líquido cefalorraquídeo, fluido linfático, muestras de la piel, secreciones de la piel, tracto respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, órganos, biopsias y también muestras de constituyentes de cultivos celulares *in vitro* incluyendo, pero sin limitarse a, los medios acondicionados resultantes del crecimiento de células y tejidos en medio de cultivo, por ejemplo, células recombinantes, y componentes celulares. Las muestras biológicas preferentes son sangre, plasma y suero.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "marcador" y la expresión "marcador detectable" se refieren a una molécula que puede detectarse, incluyendo, pero sin limitarse a, isótopos radiactivos, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes, cromóforos, enzimas, sustratos de enzimas, cofactores de enzimas, inhibidores de enzimas, cromóforos, colorantes, iones metálicos, sales metálicos, ligandos (por ejemplo, biotina, avidina, estreptavidina o haptenos) y similares. La expresión "agente fluorescente" se refiere a una sustancia o a una porción de la misma que es capaz de presentar fluorescencia en el intervalo detectable.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "soporte sólido" se refiere a una superficie sólida tal como una perla magnética, perla de látex, placa de microtitulación, placa de vidrio, nailon, agarosa, acrilamida, y similares.

II. Modos de llevar a cabo la invención

Antes de describir la presente invención detalladamente, debe entenderse que la presente invención no está limitada a parámetros de proceso o formulaciones concretas ya que éstos, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el fin de describir las formas de realización concretas de la invención solamente, y no pretende ser limitativa.

Aunque en la práctica de la presente invención pueden utilizarse una serie de composiciones y métodos similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, en el presente documento se describen los materiales y métodos preferentes.

Como ha indicado anteriormente, la presente invención se basa en el descubrimiento de nuevos métodos de diagnóstico para la detección precisa de la infección por el virus de la hepatitis A (VHA) en una muestra biológica. Los métodos se basan en técnicas de detección sensibles basadas en ácidos nucleicos que permiten la identificación de secuencias de ácidos nucleicos diana de VHA en muestras que contienen cantidades pequeñas de virus. En concreto, el inventor de la presente invención ha descubierto que el uso de secuencias de la 5' UTR del genoma de VHA proporciona la detección rápida y sensible de VHA en muestras biológicas. Las secuencias para el genoma de VHA, incluyendo la 5' UTR, en una serie de aislados de VHA son conocidas. Véanse, por ejemplo, los números de acceso del NCBI K02990; AB020564; AB020565; AB020566; AB020567; AB020568; AB020569; AF268396; M16632; M14707; M20273; NC001489; X83302; Cohen *et al.*, J. Virol. (1987) 61:50-59. Al comparar las secuencias de los diversos aislados de VHA, pueden identificarse fácilmente estas y otras secuencias 5' UTR utilizadas con la presente invención. Por motivos prácticos, las diversas moléculas de ácido nucleico utilizadas con la presente invención se han numerado con relación al N° de acceso del NCBI K02990. La secuencia 5' UTR se produce en las posiciones 1-723 del N° de acceso del NCBI K02990.

En la estrategia de la presente invención, los ácidos nucleicos diana se separan del ADN/ARN no homólogo. Los ácidos nucleicos diana se separan utilizando oligonucleótidos de captura inmovilizados en un soporte sólido, en el que los oligonucleótidos de captura pueden ser específicos para el organismo a detectar. Para el VHA, los ácidos nucleicos diana separados se amplifican utilizando los cebadores de la 5' UTR. Los cebadores de esta región son cebadores que comprenden la secuencia de las SEQ ID NOS: 1 y 2 (Figura 1).

En un aspecto de la presente invención, la muestra biológica que potencialmente lleva el ácido nucleico diana se pone en contacto con un soporte sólido que tiene los oligonucleótidos de captura. Los oligonucleótidos de captura pueden estar asociados con el soporte sólido, por ejemplo, por unión covalente del resto de sonda al soporte sólido, por asociación de afinidad, uniones de hidrógeno, o asociación no específica.

Los oligonucleótidos de captura son de 10 a aproximadamente 60 nucleótidos, o cualquier número entero dentro de estos intervalos, tal como una secuencia que incluye 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26...35...40, etc. nucleótidos de la región de interés. Los oligonucleótidos de captura derivan de la secuencia 5' UTR de un aislado de VHA, tales como los representados en las Figuras 3A-3F (SEQ ID NOS :10-15) en el presente documento.

El oligonucleótido de captura puede fijarse al soporte sólido de diversas maneras. Por ejemplo, el oligonucleótido puede fijarse al soporte sólido por fijación del nucleótido terminal 3' ó 5' del oligonucleótido de captura al soporte sólido. Más preferentemente, el oligonucleótido de captura se fija al soporte sólido mediante un conector que sirve para distanciar la sonda del soporte sólido. El conector tiene generalmente una longitud de al menos 10-50 átomos, más preferentemente una longitud de al menos 15-30 átomos. La longitud necesaria del conector dependerá del soporte sólido concreto utilizado. Por ejemplo, cuando se utiliza como soporte sólido de poliestireno altamente reticulado, generalmente resulta suficiente un conector de seis átomos.

En la técnica se conoce una gran variedad de conectores que pueden utilizarse para fijar el oligonucleótido de captura al soporte sólido. El conector puede estar hecho de cualquier compuesto que no interfiera significativamente con la hibridación de la secuencia diana con el oligonucleótido de captura fijado al soporte sólido. El conector puede estar hecho de un oligonucleótido homopolimérico que puede añadirse fácilmente al conector mediante síntesis automatizada. La secuencia homopolimérica puede ser 5' ó 3' respecto a la secuencia específica del virus. En un aspecto de la invención, los oligonucleótidos de captura pueden estar enlazados a una cadena de homopolímero, tal como, por ejemplo, poli A, poli T, poli G, poli C, poli U, poli dA, poli dT, poli dG, poli dC, o poli dU con el fin de facilitar la fijación al soporte sólido. La cadena de homopolímero puede tener una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 nucleótidos, o preferentemente tener una longitud de aproximadamente 12 a aproximadamente 25 nucleótidos, o cualquier número entero dentro de estos intervalos, como por ejemplo, 10...12...16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, ó 24 nucleótidos.

Las secuencias homopoliméricas representativas incluyen secuencias poli T o poli A. Como alternativa, pueden utilizarse como conector polímeros tales como polietilenglicol funcionalizado. Tales polímeros no interfieren significativamente con la hibridación de la sonda con el oligonucleótido diana. Ejemplos de enlaces incluyen enlaces polietilenglicol, carbamato y amida. Preferentemente, los enlaces entre el soporte sólido, el conector y el oligonucleótido de captura no se escinden durante la eliminación de los grupos protectores de bases en condiciones básicas a alta temperatura.

El oligonucleótido de captura también puede estar fosforilado en el extremo 3' con el fin de evitar la prolongación del oligonucleótido de captura.

El soporte sólido descrito en el presente documento puede tener muchas formas incluyendo, por ejemplo, nitrocelulosa reducida a forma de partículas y recuperable al pasar el medio de muestra que contiene el soporte a través de un tamiz; nitrocelulosa o los materiales impregnados con partículas magnéticas o similares, que permiten que la nitrocelulosa migre al interior del medio de muestra tras la aplicación de un campo magnético; perlas o partículas que pueden filtrarse o que presentan propiedades electromagnéticas; perlas de poliestireno que se reparten en la superficie de un medio acuoso; y sílice magnetizada. Los ejemplos de los tipos preferentes de soportes sólidos para la inmovilización del oligonucleótido de captura incluyen vidrio de poro controlado, placas de vidrio, poliestireno, perlas de poliestireno recubiertas de avidina, celulosa, nailon, gel de acrilamida y dextrano activado.

Un aspecto de la presente invención incluye un soporte sólido que comprende perlas magnéticas, opcionalmente las perlas magnéticas contienen grupos funcionales amina primaria que facilitan la asociación o unión covalente de los oligonucleótidos de captura a las partículas magnéticas de soporte. Como alternativa, las perlas magnéticas tienen homopolímeros inmovilizados en las mismas, tales como secuencias poli T o poli A. El uso de un soporte sólido con perlas magnéticas permite un método de aislamiento, amplificación y detección en un único recipiente, ya que el soporte sólido puede separarse de la muestra biológica por medios magnéticos.

Las perlas magnéticas pueden producirse utilizando técnicas convencionales u obtenerse a partir de fuentes comerciales. En general, las perlas pueden estar compuestas por partículas magnéticas, aunque también pueden ser otro metal u óxidos metálicos magnéticos, ya sea en forma impura, de aleación o de compuesto, siempre que tengan una superficie reactiva y presenten la capacidad de reaccionar a un campo magnético. Otros materiales que pueden utilizarse individualmente o en combinación con hierro incluyen, pero no se limitan a, cobalto, níquel y silicio. Una perla magnética adecuada para la aplicación en la presente invención incluye perlas magnéticas que contienen grupos poli dT comercializadas con el nombre comercial de perlas magnéticas de oligonucleótidos Sera-Mag™ de Seradyn, Indianápolis, IN. La sílice magnética adecuada para la aplicación en la presente invención incluye sílice magnética MagPrep™ de Novagen, Madison, WI.

A continuación, se inicia la asociación de los oligonucleótidos de captura con el soporte sólido poniendo en contacto el soporte sólido con el medio que contiene los oligonucleótidos de captura. En un aspecto, la perla magnética que contiene los grupos poli dT se hibrida con las secuencias diana que comprenden poli dA contiguas a la secuencia seleccionada de la región monocatenaria conservada del genoma de VHA. La poli dA en el oligonucleótido de captura y la poli dT en el soporte sólido hibridan asociando o inmovilizando de ese modo los oligonucleótidos de captura con el soporte sólido. En otro aspecto, la perla magnética tiene inmovilizadas en su superficie secuencias de nucleótidos de aproximadamente 10 a aproximadamente 75 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 nucleótidos derivados de las secuencias de nucleótidos descritas en el documento WO 03/031934.

El soporte sólido se pone en contacto con la muestra biológica en condiciones de altas concentraciones de sales caotrópicas o en condiciones de hibridación. Los oligonucleótidos de captura hibridan con las hebras diana presentes en la muestra biológica. Por lo general, las hibridaciones de oligonucleótidos de captura con las dianas pueden lograrse en aproximadamente 15 minutos, pero pueden tardar hasta de 3 a 48 horas.

En otro aspecto de la descripción, las partículas magnéticas de sílice se exponen al medio que contiene el material diana en condiciones diseñadas para promover la formación de un complejo. El complejo se forma más preferentemente en una mezcla de la partícula magnética de sílice, el medio, y una sal caotrópica.

Las sales caotrópicas son sales de iones caotrópicos que son muy solubles en soluciones acuosas. Los iones caotrópicos proporcionados por tales sales, a una concentración suficientemente alta en soluciones acuosas de proteínas o ácidos nucleicos, hacen que las proteínas se desplieguen, los ácidos nucleicos pierdan la estructura secundaria o, en el caso de ácidos nucleicos bicatenarios, se desnaturalicen. Se cree que los iones caotrópicos tienen estos efectos porque interrumpen la red de enlaces de hidrógeno que existe en el agua líquida y de ese modo hacen las proteínas desnaturalizadas y los ácidos nucleicos termodinámicamente más estables que sus equivalentes correctamente plegados o estructurados. Los iones caotrópicos representativos incluyen, pero no se limitan a, guanidinio, yoduro, perclorato y tricloroacetato. Resulta preferente el ion guanidinio. Las sales caotrópicas incluyen, pero no se limitan a, clorhidrato de guanidina, tiocianato de guanidina, yoduro sódico, perclorato sódico y tricloroacetato sódico. Resultan preferentes las sales de guanidinio, y resulta especialmente preferente el tiocianato de guanidina.

La concentración de iones caotrópicos utilizada en la presente práctica se encuentra preferentemente entre aproximadamente 0,1 M y 7 M, pero más preferentemente entre aproximadamente 0,5 M y 5 M. La concentración de iones caotrópicos en la mezcla debe ser suficientemente alta para hacer que el material diana biológico se adhiera a las partículas magnéticas de sílice en la mezcla, pero no tan alta como para sustancialmente desnaturalizar, para degradar, o para hacer que el material diana precipite de la mezcla. Las proteínas y moléculas grandes de ácido

nucleico bicatenario, tales como los ácidos nucleicos virales, son estables a concentraciones de sales caotrópicas entre 0,5 M y 2 M, pero se sabe que precipitan de la solución a concentraciones de sales caotrópicas por encima de aproximadamente 2 M.

En un aspecto, el complejo formado como se ha descrito anteriormente se incuba hasta que al menos parte del material de ácido nucleico se adhiere a la partícula magnética de sílice para formar un complejo. Esta etapa de incubación se lleva a cabo a una temperatura de al menos aproximadamente 0°C, preferentemente al menos aproximadamente 4°C, y más preferentemente al menos aproximadamente 20°C, siempre que la temperatura de incubación no sea superior a aproximadamente 75°C. Por lo tanto, en el presente documento se utilizarán temperaturas en el intervalo comprendido entre 0°C y 75°C, preferentemente 4°C y 50°C, y lo más preferentemente, aproximadamente 15°C y aproximadamente 35°C, o cualquier número entero dentro de estos intervalos. La etapa de incubación se lleva a cabo preferentemente a una temperatura por debajo de la temperatura a la que las partículas magnéticas de sílice comienzan a perder su capacidad para unirse reversiblemente al material de ácido nucleico, y puede llevarse a cabo a aproximadamente temperatura ambiente (es decir a aproximadamente 25°C).

A continuación, se separa el soporte sólido de la muestra biológica mediante filtración, pasando a través de una columna, o por medios magnéticos. Como el experto en la materia entenderá, el método de separación dependerá del tipo de soporte sólido seleccionado. Dado que las dianas están hibridadas con los oligonucleótidos de captura inmovilizados en el soporte sólido, las hebras diana se separan de ese modo de las impurezas en la muestra. En algunos casos, puede haber todavía proteínas, hidratos de carbono, lípidos, restos celulares, ácidos nucleicos extraños y otras impurezas unidas al soporte, aunque en concentraciones mucho menores de las encontradas inicialmente en la muestra biológica. Los expertos en la materia reconocerán que pueden eliminarse algunos materiales no deseados lavando el soporte con un medio de lavado. La separación del soporte sólido de la muestra biológica elimina preferentemente al menos aproximadamente un 70%, más preferentemente aproximadamente un 90% y, lo más preferentemente, al menos aproximadamente un 95% de los ácidos nucleicos no diana presentes en la muestra.

Los métodos de la presente invención también incluyen la amplificación del oligonucleótido diana capturado para producir ácidos nucleicos amplificados. La amplificación de un ácido nucleico diana utiliza una polimerasa de ácido nucleico para producir múltiples copias del oligonucleótido diana o fragmentos del mismo. Las técnicas de amplificación adecuadas son bien conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, la amplificación asociada a la transcripción, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la amplificación mediada por replicasa, y la reacción en cadena de la ligasa (LCR).

Los cebadores utilizados con los ensayos de la invención son preferentemente únicos para el organismo cuya presencia se va a detectar. Por lo tanto, para la detección del VHA, los cebadores derivan de las regiones conservadas de la región no traducida del VHA, tales como las mostradas en la Figura 1.

Los cebadores y oligonucleótidos de captura utilizados en los ensayos se sintetizan fácilmente mediante técnicas convencionales, por ejemplo, síntesis en fase sólida por medio de la química de la fosforamidita, como se describe en las patentes de EE.UU. N^{os} 4.458.066 y 4.415.732; Beaucage *et al.*, (1992) Tetrahedron 48: 2223-2311, y Applied Biosystems User Bulletin N^o 13 (1 de abril de 1987). Otros métodos de síntesis química incluyen, por ejemplo, el método del fosfotriéster descrito por Narang *et al.*, Meth. Enzymol. (1979) 68:90 y el método del fosfodiéster descrito por Brown *et al.*, Meth. Enzymol. (1979) 68:109. Utilizando estos mismos métodos, pueden incorporarse en las sondas poli(A) o poli(C), u otras extensiones de nucleótidos no complementarios. Pueden acoplarse a las sondas extensiones de óxido de hexaetileno por métodos conocidos en la técnica. Cload *et al.*, (1991) J. Am. Chem. Soc. 113:6324-6326; la patente de EE.UU. N^o 4.914.210 de Levenson *et al.*; Durand *et al.*, (1990) Nucleic Acids Res. 18:6353-6359; y Horn *et al.*, (1986) Tet. Lett. 27:4705-4708. Las secuencias de cebador se encuentran en el intervalo comprendido entre 10-60 nucleótidos de longitud, tales como 15-60, 20-40 y así sucesivamente, más generalmente en el intervalo comprendido entre 18-40 nucleótidos de longitud, y cualquier longitud entre los intervalos indicados. La sonda típica se encuentra en el intervalo comprendido entre 10-50 nucleótidos de longitud, tal como 15-40, 18-30, y así sucesivamente, y cualquier longitud entre los intervalos indicados.

Además, las sondas pueden acoplarse a marcadores para la detección. Existen varios medios conocidos para la derivatización de oligonucleótidos con funcionalidades reactivas que permiten la adición de un marcador. Por ejemplo, se dispone de varios enfoques para la biotilación de sondas de manera que puedan fijarse marcadores radiactivos, fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimáticos o electrodensos por medio de avidina. Véase, por ejemplo, Broken *et al.*, Nucl. Acids Res. (1978) 5:363-384, que describe el uso de marcadores de ferritina-avidina-biotina; y Chollet *et al.*, Nucl. Acids Res. (1985) 13:1529-1541, que describe la biotilación de los extremos terminales 5' de los oligonucleótidos por medio de un brazo conector aminoalquilfosforamida. También se dispone de varios métodos para sintetizar oligonucleótidos derivatizados de grupos amino que se marcan fácilmente mediante compuestos fluorescentes u otro tipo de compuestos derivatizados por grupos aminorreactivos, tales como isotiocianato, N-hidroxisuccinimida, o similares, véase, por ejemplo, Connolly (1987) Nucl. Acids Res. 15:3131-3139, Gibson *et al.*, (1987) Nucl. Acids Res. 15:6455-6467 y la patente de EE.UU. N^o 4.605.735 de Miyoshi *et al.* También se dispone de métodos para sintetizar oligonucleótidos derivatizados de sulfhidrilo que pueden reaccionar con marcadores específicos para tiol, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N^o 4.757.141 de Fung *et al.*, Connolly *et*

al., (1985) Nucl. Acids Res. 13:4485-4502 y Spoot *et al.*, (1987) Nucl. Acids Res. 15:4837-4848. En Matthews *et al.*, Anal. Biochem. (1988) 169:1-25 se proporciona una revisión exhaustiva de las metodologías para marcar fragmentos de ácidos nucleicos.

5 Por ejemplo, las sondas pueden marcarse con fluorescencia enlazando una molécula fluorescente al extremo terminal no ligante de la sonda. La guía para seleccionar los marcadores fluorescentes apropiados puede encontrarse en Smith *et al.*, Meth. Enzymol. (1987) 155:260-301; Karger *et al.*, Nucl. Acids Res. (1991) 19:4955-4962; Haugland (1989) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). Los marcadores fluorescentes preferentes incluyen fluoresceína y derivados de la misma, tales como
10 los descritos en la patente de EE.UU. N° 4.318.846 y Lee *et al.*, Cytometry (1989) 10:151-164, y 6-FAM (fluoresceína), JOE (2',7'-dimetoxi-4',5'-diclorofluoresceína), TAMRA (tetrametil rodamina), ROX (rodamina X), HEX-1, HEX-2, ZOE, TET-1 o 2-NAN, y similares.

15 Además, pueden marcarse las sondas con un éster de acridinio (AE) utilizando las técnicas que se describen más adelante. Las tecnologías actuales permiten colocar el marcador AE en cualquier emplazamiento dentro de la sonda. Véase, por ejemplo, Nelson *et al.*, (1995) "Detection of Acridinium Esters by Chemiluminescence" en Nonisotopic Probing, Blotting and Sequencing, Kricka L.J. (ed.) Academic Press, San Diego, CA; Nelson *et al.*, (1994) "Application of the Hybridization Protection Assay (HPA) to PCR" en The Polymerase Chain Reaction, Mullis *et al.*, (Eds.) Birkhauser, Boston, MA; Weeks *et al.*, Clin. Chem. (1983) 29:1474-1479; Berry *et al.*, Clin. Chem. (1988)
20 34:2087-2090. Puede fijarse una molécula de AE directamente a la sonda utilizando la química de brazo conector basada en no nucleótidos que permite colocar el marcador en cualquier emplazamiento dentro de la sonda. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N°s 5.585.481 y 5.185.439.

25 En determinadas formas de realización, se añade un testigo interno (IC) o un patrón interno para que sirva como testigo para la captura y amplificación de la diana. Preferentemente, el IC incluye una secuencia que difiere de las secuencias diana, es capaz de hibridar con las secuencias de sonda utilizadas para separar los oligonucleótidos específicos para el organismo de la muestra, y es capaz de amplificación. El uso del testigo interno permite controlar el proceso de separación, el proceso de amplificación, y el sistema de detección, y permite monitorizar el rendimiento del ensayo y la cuantificación de la(s) muestra(s). El IC puede incluirse en cualquier punto adecuado,
30 por ejemplo, en el tampón de lisis. En una forma de realización, el IC comprende ARN que contiene una parte de la secuencia de nucleótidos de VHA y una única secuencia que hibrida con la sonda. Por lo tanto, en determinadas formas de realización, el IC incluye una porción del genoma de VHA con una secuencia modificada con 5-30, tal como 6...9...12...15...20, y así sucesivamente, o más bases sustituidas con otras bases. Las bases sustitutas pueden situarse por toda la longitud de la secuencia diana de manera que solamente se sustituyan 2 ó 3 secuencias
35 consecutivas. en la figura 4B se muestra un IC representativo para el VHA y comprende 721 pb derivadas de la 5' UTR del genoma de VHA. Las bases en mayúsculas y negrita de la Figura 4B representan las bases que han sustituido a las bases que se dan en la secuencia de tipo silvestre (véase la Figura 4A). El ensayo puede incluir adicionalmente sondas específicas para el patrón interno (sonda IC).

40 Las sondas representativas para la secuencia IC se detallan en los ejemplos como las SEQ ID NOS: 18 y 19. La sonda IC puede acoplarse opcionalmente a un marcador detectable que sea diferente del marcador detectable para la secuencia diana. En las formas de realización en las que el marcador detectable es un fluoróforo, el IC puede cuantificarse por espectrofotometría y mediante estudios del límite de detección.

45 Por lo general, el número de copias de IC que no interfiere con la detección de la diana se determina mediante titulación del IC con una de UI/copias/UFP de diana fija, preferentemente en el extremo inferior, y se genera una curva patrón diluyendo una muestra del patrón aceptado internacionalmente.

50 En otra forma de realización, se combina un IC, tal como se describe en el presente documento, con ARN aislado de la muestra de acuerdo con las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. A continuación, se transcribe inversamente el ARN utilizando una transcriptasa inversa para proporcionar el ADNc. Las secuencias de ADNc pueden amplificarse opcionalmente (por ejemplo, mediante PCR) utilizando cebadores marcados. Se separan los productos de amplificación, por lo general por electroforesis, y se determina la cantidad de marcador incorporado (proporcional a la cantidad de producto amplificado). A continuación se calcula la cantidad de ARNm en la muestra
55 por comparación con la señal producida por los patrones conocidos.

Los cebadores y sondas descritos anteriormente pueden utilizarse en técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la infección por VHA en muestras biológicas. La PCR es una técnica para
60 amplificar una secuencia de ácido nucleico diana deseada contenida en una molécula o mezcla de moléculas de ácido nucleico. En la PCR, se emplea en exceso un par de cebadores para que hibriden con las hebras complementarias del ácido nucleico diana. Cada uno de los cebadores se prolonga mediante una polimerasa utilizando el ácido nucleico diana como molde. Los productos de prolongación se convierten en secuencias diana después de la disociación de la hebra diana original. A continuación, los nuevos cebadores se hibridan y se prolongan mediante una polimerasa, y se repite el ciclo para aumentar geométricamente el número de moléculas de
65 secuencia diana. El método de PCR para amplificar las secuencias de ácidos nucleicos diana en una muestra se conoce bien en la técnica y se ha descrito, por ejemplo, en Innis *et al.*, (eds.) PCR Protocols (Academic Press,

Nueva York 1990); Taylor (1991) Polymerase chain reaction: basic principles and automation, in PCR: A Practical Approach, McPherson *et al.*, (eds.), IRL Press, Oxford; Saiki *et al.*, (1986) Nature 324:163; así como en las patentes de EE.UU. N^{os} 4.683.195, 4.683.202 y 4.889.818.

En concreto, la PCR utiliza cebadores oligonucleótido relativamente cortos que flanquean la secuencia de nucleótidos diana a amplificar, orientados de manera que sus extremos 3' se enfrenten entre sí, prolongándose cada cebador hacia el otro. La muestra de polinucleótido se extrae y se desnaturaliza, preferentemente mediante calor, y se hibrida con los cebadores primero y segundo que están presentes en exceso molar. La polimerización se cataliza en presencia de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP, dATP, dGTP, dCTP y dTTP) utilizando un agente de polimerización de polinucleótidos dependiente del cebador y del molde, tal como cualquier enzima capaz de producir productos de prolongación de cebador, por ejemplo, ADN polimerasa I de *E. coli*, fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, ADN polimerasa de T4, ADN polimerasas termoestables aisladas de *Thermus aquaticus* (Taq), disponibles de una variedad de fuentes (por ejemplo, Perkin Elmer), *Thermus thermophilus* (United States Biochemicals), *Bacillus stearothermophilus* (Bio-Rad), o *Thermococcus litoralis* (polimerasa "Vent", New England Biolabs). Esto da como resultado dos "productos largos" que contienen los respectivos cebadores en sus extremos 5' enlazados covalentemente a los complementos de nueva síntesis de las hebras originales. A continuación se devuelve la mezcla de reacción a las condiciones de polimerización, por ejemplo, reduciendo la temperatura, inactivando un agente desnaturante, o añadiendo más polimerasa, y se inicia un segundo ciclo. El segundo ciclo proporciona las dos hebras originales, los dos productos largos del primer ciclo, dos nuevos productos largos replicados a partir de las hebras originales, y dos "productos cortos" replicados a partir de los productos largos. Los productos cortos tienen la secuencia de la secuencia diana con un cebador en cada extremo. En cada ciclo adicional, se producen otros dos productos largos, y una serie de productos cortos igual al número de productos largos y cortos que quedan al final del ciclo anterior. Por lo tanto, el número de productos cortos que contienen la secuencia diana crecen exponencialmente con cada ciclo. Preferentemente, la PCR se lleva a cabo con un termociclador disponible en el mercado, por ejemplo, Perkin Elmer.

Los ARN pueden amplificarse por transcripción inversa del ARNm a ADNc, y a continuación realizando la PCR (RT-PCR), como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, puede utilizarse una única enzima para ambas etapas como se describe en la patente de EE.UU. N^o 5.322.770. El ARNm también puede transcribirse inversamente a ADNc, seguido de reacción en cadena de la ligasa con huecos asimétricos (RT-AGLCR) como describen Marshall *et al.*, (1994) PCR Meth. App. 4:80-84.

El ensayo fluorogénico de 5'-nucleasa, conocido como ensayo TaqManTM (Perkin-Elmer), es un sistema de detección basado en PCR potente y versátil para dianas de ácidos nucleicos. Por tanto, los cebadores y las sondas derivadas de las regiones del genoma de VHA que se describen en el presente documento pueden utilizarse en los análisis Taq-ManTM para detectar la presencia de infección en una muestra biológica. El análisis se realiza junto con termociclación monitorizando la generación de señales de fluorescencia. El sistema de ensayo prescinde de la necesidad de un análisis electroforético en gel, y tiene la capacidad para generar datos cuantitativos que permiten la determinación del número de copias de la diana.

El ensayo fluorogénico de 5'-nucleasa se realiza convenientemente utilizando, por ejemplo, ADN polimerasa AmpliTaq GoldTM, que tiene actividad 5'-nucleasa endógena, para digerir una sonda oligonucleótido interna marcada con un colorante indicador fluorescente y un extintor de fluorescencia (véase, Holland *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1991) 88:7276-7280; y Lee *et al.*, Nucl. Acids Res. (1993) 21:3761-3766). Los resultados del ensayo se detectan midiendo los cambios en la fluorescencia que se producen durante el ciclo de amplificación a medida que la sonda fluorescente es digerida, desacoplando los marcadores colorante y extintor de fluorescencia y provocando un aumento de la señal fluorescente que es proporcional a la amplificación de ácido nucleico diana.

Los productos de amplificación pueden detectarse en solución o utilizando soportes sólidos. En este método, la sonda Taq-ManTM está diseñada para hibridar con una secuencia diana dentro del producto de la PCR deseado. El extremo 5' de la sonda Taq-ManTM contiene un colorante indicador fluorescente. El extremo 3' de la sonda está bloqueado para evitar la prolongación de la sonda y contiene un colorante que extinguirá la fluorescencia del fluoróforo 5'. Durante la posterior amplificación, el marcador fluorescente 5' se escinde si está presente en la reacción una polimerasa con actividad 5'-exonucleasa. La escisión del fluoróforo 5' da como resultado un aumento de la fluorescencia que puede detectarse.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención se refiere a métodos para amplificar una secuencia de nucleótidos de VHA diana utilizando una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad 5' a 3'-nucleasa, uno o más cebadores capaces de hibridar con la secuencia de VHA diana, y una sonda oligonucleótido capaz de hibridar con la secuencia 3' de VHA diana con respecto al cebador. Durante la amplificación, la polimerasa digiere la sonda oligonucleótido cuando está hibridada con la secuencia diana, separando de ese modo la molécula indicadora de la molécula extintora de fluorescencia. A medida que se lleva a cabo la amplificación, se monitoriza la fluorescencia de la molécula indicadora, correspondiéndose la fluorescencia con la existencia de amplificación de ácidos nucleicos. La molécula indicadora es preferentemente un colorante de fluoresceína y la molécula extintora de fluorescencia es preferentemente un colorante de rodamina.

Mientras que la longitud de los cebadores y sondas puede variar, las secuencias de sonda se seleccionan de manera que tengan una temperatura de fusión más alta que las secuencias de cebador. Preferentemente, las secuencias de sonda tienen una temperatura de fusión estimada que es aproximadamente 10°C superior a la temperatura de fusión para las secuencias de cebador de amplificación. Por tanto, las secuencias de cebador son generalmente más cortas que las secuencias de sonda. Por lo general, las secuencias de cebador se encuentran en el intervalo comprendido entre 10-75 nucleótidos de longitud, más generalmente en el intervalo comprendido entre 20-45. La sonda típica se encuentra en el intervalo comprendido entre 10-50 nucleótidos de longitud, más generalmente 15-40 nucleótidos de longitud.

Para una descripción detallada del ensayo TaqMan™, los reactivos y las condiciones utilizadas en el mismo, véase, por ejemplo, Holland *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1991) 88:7276-7280; las patentes de EE.UU. N^{os} 5.538.848, 5.723.591, y 5.876.930.

Las secuencias de VHA descritas en el presente documento también pueden utilizarse como base para los ensayos de amplificación mediada por transcripción (TMA). La TMA proporciona un método de identificación de secuencias de ácidos nucleicos diana presentes en cantidades muy pequeñas en una muestra biológica. Tales secuencias pueden ser difíciles o imposibles de detectar utilizando métodos directos de ensayo. En concreto, la TMA es un sistema de amplificación de ácidos nucleicos diana autocatalítico e isotérmico, que puede proporcionar más de mil millones de copias de ARN de una secuencia diana. El ensayo puede realizarse cualitativamente, para detectar con precisión la presencia o ausencia de la secuencia diana en una muestra biológica. El ensayo también puede proporcionar una medida cuantitativa de la cantidad de secuencia diana en un intervalo de concentraciones de varios órdenes de magnitud. La TMA proporciona un método para sintetizar autocatalíticamente múltiples copias de una secuencia de ácidos nucleicos diana sin manipulación repetitiva de las condiciones de reacción tales como la temperatura, la fuerza iónica y el pH.

En general, la TMA incluye las siguientes etapas: (a) aislar el ácido nucleico, incluyendo ARN, a partir de la muestra biológica de interés de la que se sospecha que está infectada con VHA; y (b) combinar en una mezcla de reacción (i) el ácido nucleico aislado, (ii) los cebadores oligonucleótido primero y segundo, teniendo el primer cebador una secuencia formadora de complejos suficientemente complementaria a la porción terminal 3' de una secuencia de ARN diana, si está presente (por ejemplo la hebra (+)), para formar complejos con la misma, y teniendo el segundo cebador una secuencia formadora de complejos suficientemente complementaria a la porción terminal 3' de la secuencia diana de su complemento (por ejemplo, la hebra (-)) para formar complejos con la misma, en el que el primer oligonucleótido comprende adicionalmente una secuencia 5' respecto a la secuencia formadora de complejos que incluye un promotor, (iii) una transcriptasa inversa o ADN polimerasas dependientes de ARN y ADN, (iv) una actividad enzimática que degrada selectivamente la hebra de ARN de un complejo ARN-ADN (tal como una ARNasa H) y (v) una ARN polimerasa que reconoce al promotor.

Los componentes de la mezcla de reacción pueden combinarse progresivamente o a la vez. La mezcla de reacción se incuba en condiciones en las que se forma una secuencia de oligonucleótido/diana, que incluye el cebado del ácido nucleico y las condiciones de síntesis del ácido nucleico (incluyendo trifosfatos de ribonucleótido y trifosfatos de desoxirribonucleótidos) durante un período de tiempo suficiente para proporcionar múltiples copias de la secuencia diana. La reacción tiene lugar ventajosamente en condiciones adecuadas para mantener la estabilidad de los componentes de la reacción tales como las enzimas constitutivas y sin necesitar modificación o manipulación de las condiciones de reacción durante la reacción de amplificación. En consecuencia, la reacción puede tener lugar en condiciones que son sustancialmente isotérmicas e incluyen una fuerza iónica y un pH sustancialmente constantes. Convenientemente, la reacción no necesita una etapa de desnaturalización para separar el complejo ARN-ADN producido por la primera reacción de prolongación del ADN.

Las ADN polimerasas adecuadas incluyen transcriptasas inversas, tales como la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) (disponible, por ejemplo, en Seikagaku America, Inc.) y la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV) (disponible, por ejemplo, en Bethesda Research Laboratories).

Los promotores o secuencias de promotor adecuadas para su incorporación en los cebadores son secuencias de ácidos nucleicos (ya sean de origen natural, producidas mediante síntesis o un producto de una digestión de restricción) que son reconocidas específicamente por una ARN polimerasa que reconoce y se une a esa secuencia e inicia el proceso de transcripción mediante el cual se producen los transcritos de ARN. La secuencia puede incluir opcionalmente bases de nucleótidos que se prolongan más allá del sitio de reconocimiento real para la ARN polimerasa que puede conferir susceptibilidad o estabilidad adicional a los procesos de degradación o una mayor eficacia de la transcripción. Los ejemplos de promotores útiles incluyen aquellos que son reconocidos por determinadas polimerasas de bacteriófagos tales como las de los bacteriófagos T3, T7 o SP6, o un promotor de *E. coli*. Estas ARN polimerasas están fácilmente disponibles en fuentes comerciales, tales como New England Biolabs y Epicentre.

Algunas de las transcriptasas inversas adecuadas utilizadas en los métodos de la presente invención tienen una actividad ARNasa H, tal como la transcriptasa inversa de AMV. Sin embargo, puede resultar preferente añadir ARNasa

H exógena, tal como la ARNasa H de *E. coli*, incluso cuando se utiliza transcriptasa inversa de AMV. La ARNasa H está fácilmente disponible, por ejemplo, en Bethesda Research Laboratories.

Los transcritos de ARN producidos por estos métodos pueden servir como moldes para producir copias adicionales de la secuencia diana a través de los mecanismos descritos anteriormente. El sistema es autocatalítico y la amplificación se produce autocatalíticamente sin necesidad de modificar o cambiar repetidamente las condiciones de reacción tales como la temperatura, el pH, la fuerza iónica o similares.

La detección puede realizarse utilizando una gran variedad de métodos, que incluyen secuenciación directa, hibridación con oligómeros específicos de secuencia, electroforesis en gel y espectrometría de masas. Estos métodos pueden utilizar formatos heterogéneos u homogéneos, marcadores isotópicos o no isotópicos, así como no utilizar marcadores en absoluto.

Un método preferente de detección es el uso de las sondas oligonucleótido específicas de secuencia diana descritas anteriormente. Las sondas pueden utilizarse en ensayos de protección de hibridación (HPA). En esta forma de realización, las sondas están convenientemente marcadas con éster de acridinio (AE), una molécula muy quimioluminiscente. Véase, por ejemplo, Nelson *et al.*, (1995) "Detection of Acridinium Esters by Chemiluminescence" en Nonisotopic Probing, Blotting and Sequencing, Kricka L.J. (ed.) Academic Press, San Diego, CA; Nelson *et al.*, (1994) "Application of the Hybridization Protection Assay (HPA) to PCR " en The Polymerase Chain Reaction, Mullis *et al.*, (eds.) Birkhauser, Boston, MA; Weeks *et al.*, Clin. Chem. (1983) 29:1474-1479; Berry *et al.*, Clin. Chem. (1988) 34:2087-2090. Se fija directamente a la sonda una molécula de AE utilizando una química de brazo conector basada en no nucleótidos que permite colocar el marcador en cualquier emplazamiento dentro de la sonda. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N^{os} 5.585.481 y 5.185.439. La quimioluminiscencia se activa por reacción con peróxido de hidrógeno alcalino que produce una N-metil acridona excitada que posteriormente vuelve al estado fundamental con la emisión de un fotón.

Cuando la molécula de AE se une covalentemente a una sonda de ácido nucleico, la hidrólisis es rápida en condiciones ligeramente alcalinas. Cuando la sonda marcada con AE es exactamente complementaria al ácido nucleico diana, la velocidad de hidrólisis de AE se reduce considerablemente. Por lo tanto, la sonda marcada con AE hibridada y sin hibridar se puede detectar directamente en la solución, sin necesidad de separación física.

El HPA consiste generalmente en las siguientes etapas: (a) la sonda marcada con AE se hibrida con el ácido nucleico diana en solución durante aproximadamente 15 a aproximadamente 30 minutos. A continuación se añade una solución alcalina suave y se hidroliza el AE acoplado a la sonda no hibridada. Esta reacción tarda aproximadamente de 5 a 10 minutos. El AE asociado al híbrido restante se detecta como una medida de la cantidad de diana presente. Esta etapa dura aproximadamente de 2 a 5 segundos. Preferentemente, la etapa de hidrólisis diferencial se lleva a cabo a la misma temperatura que la etapa de hibridación, por lo general de 50°C a 70°C. Como alternativa, pueden llevarse a cabo una segunda etapa de hidrólisis diferencial a temperatura ambiente. Esto permite utilizar pH elevados, por ejemplo en el intervalo comprendido entre 10-11, que produce grandes diferencias en la velocidad de hidrólisis entre la sonda marcada con AE hibridada y no hibridada. El HPA se describe detalladamente, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N^{os} 6.004.745; 5.948.899; y 5.283.174.

La TMA se describe detalladamente, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N^o 5.399.491. En un ejemplo de un ensayo típico, se mezcla una muestra aislada de ácido nucleico, de la que se sospecha que contiene una secuencia diana de VHA, con un concentrado tampón que contiene el tampón, sales, magnesio, nucleótidos trifosfato, cebadores, ditiotretol, y espermidina. La reacción se incuba opcionalmente a aproximadamente 100°C durante aproximadamente dos minutos para desnaturalizar cualquier estructura secundaria. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añaden transcriptasa inversa, ARN polimerasa, y ARNasa H y se incuba la mezcla durante dos a cuatro horas a 37°C. A continuación, puede someterse a ensayo la reacción desnaturalizando el producto, añadiendo una solución de sonda, incubando 20 minutos a 60°C, añadiendo una solución para hidrolizar selectivamente la sonda no hibridada, incubando la reacción seis minutos a 60°C, y midiendo la quimioluminiscencia restante en un luminómetro.

Como resulta evidente, el diseño de los ensayos descritos en el presente documento están sujetos a gran variación, y en la técnica se conocen muchos formatos. Las descripciones anteriormente indicadas se proporcionan meramente como guía y un experto en la materia puede modificar fácilmente los protocolos descritos, utilizando técnicas bien conocidas en la técnica.

Los reactivos de ensayo descritos anteriormente, incluyendo los cebadores, las sondas, el soporte sólido con las sondas unidas, así como otros reactivos de detección, pueden proporcionarse en kits, con instrucciones adecuadas y otros reactivos necesarios, con el fin de llevar a cabo los ensayos como se ha descrito anteriormente. El kit contendrá normalmente en recipientes separados la combinación de cebadores y sondas (ya sea unidos a una matriz sólida o separados con reactivos para unirlos a la matriz), formulaciones testigo (positivo y/o negativo), reactivos marcados cuando el formato analítico lo necesite y reactivos generadores de señales (por ejemplo, sustrato de una enzima) si el marcador no genera una señal directamente. Las instrucciones (por ejemplo, por escrito, en cinta magnetofónica, VCR, CD-ROM, etc.) para llevar a cabo el ensayo estarán incluidas normalmente en

el kit. El kit también puede contener, dependiendo del ensayo concreto utilizado, otros reactivos y materiales envasados (es decir, tampones de lavado y similares). Puede llevarse a cabo ensayos convencionales, tales como los descritos anteriormente, utilizando estos kits.

5 III. Parte experimental

Más adelante se presentan ejemplos de las formas de realización específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solamente con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Se ha hecho todo lo posible para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, se debe permitir que pueda haber cierto error y desviación experimental.

En los siguientes ejemplos, las enzimas se adquirieron de fuentes comerciales, y se utilizaron de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Los filtros de nitrocelulosa y similares también se adquirieron de fuentes comerciales.

En el aislamiento de los fragmentos de ARN y de ADN, salvo donde se indica, todas las manipulaciones de ARN y ADN se realizaron de acuerdo con los procedimientos convencionales. Véase, Sambrook *et al.*, *supra*. Las enzimas de restricción, ADN ligasa de T4, ADN polimerasa I de *E. coli*, fragmento Klenow, y otros reactivos biológicos pueden adquirirse de proveedores comerciales y utilizarse de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Los fragmentos de ácidos nucleicos bicatenarios se separaron en geles de agarosa.

25 Ejemplo 1

Extracción de ARN de VHA a partir de la muestra biológica

El suero positivo para ácidos nucleicos de VHA fue adquirido en BioClinical Partners (Berkeley, CA). Se utilizaron dos enfoques para aislar el ácido nucleico de la muestra. En concreto, el ARN se extrajo mediante (a) unión a sílice; y (b) hibridación con oligonucleótidos específicos de diana.

(a) Aislamiento de ácidos nucleicos mediante unión a sílice.

El ARN se extrajo mediante unión a sílice utilizando el método descrito por Boom, R. *et al.*, (1990) "Rapid and simple method for purification of nucleic acids" J. Clin. Microbiol. 28, 495-503. En presencia de altas concentraciones de sal caotrópica tal como isotiocianato de guanidinio, los ácidos nucleicos se unen a la sílice. Los ácidos nucleicos de pequeño tamaño se unen de manera más eficaz a la sílice en condiciones de pH ácido. Los ácidos nucleicos unidos se eluyeron eficazmente en tampón de baja concentración salina con pH alcalino, a altas temperaturas. La sustitución de sílice magnetizada por sílice normal facilita enormemente las etapas de lavado y elución de aislamiento del ácido nucleico. Para capturar las partículas de sílice unidas a ácido nucleico se utilizó una base magnética, eliminando así las centrifugaciones necesarias para sedimentar las partículas de sílice normal.

El tampón de lisis utilizado fue de Organon-Teknika (Durham, NC). Este tampón de lisis contiene isotiocianato de guanidinio para solubilizar las proteínas e inactivar las ARNasas y ADNasas. El detergente Triton X-100 facilita adicionalmente el proceso de solubilización y la desintegración de la estructura celular y las proteínas nucleares, liberando así el ácido nucleico. El reactivo de lisis se acidificó para potenciar la unión del ácido nucleico, y se utilizaron 50 µl de tampón de elución alcalino para eluir el ácido nucleico unido. Se utilizaron 9,0 ml del reactivo de lisis pre-alicuatado para extraer ácido nucleico de 2,0 ml de plasma positivo para IgM anti-VHA. Se utilizó sílice magnetizada (partículas MagPrep de Novagen, Madison, WI) para capturar las partículas de sílice unidas a ácido nucleico, eliminando así las centrifugaciones necesarias para la sedimentación de las partículas de sílice normal. Los ácidos nucleicos unidos se eluyeron en 50 µl de Tris 10 mM pH 9,0 que contenía EDTA 1 mM. Tras el aislamiento del ácido nucleico, se determinó la presencia de VHA realizando una PCR TaqMan™, tal como se describe más adelante.

(b) Aislamiento de ácido nucleico mediante hibridación con oligonucleótidos específicos de diana.

Aunque el uso de sílice magnetizada facilita en gran medida la manipulación rápida y fácil durante las etapas de lavado y elución, el aislamiento del ácido nucleico sigue siendo laborioso y requiere mucho tiempo. Por lo tanto, se utilizó la captura en una etapa de la diana de ácido nucleico específica a partir del plasma o suero utilizando perlas magnéticas. Con el fin de hacer esto aplicable a una gran variedad de ensayos de captura de ácido nucleico viral, se utilizaron perlas magnéticas genéricas unidas a oligo dT. Las perlas magnéticas oligo(dT) Sera-Mag (Seradyn, Indianápolis, IN) con una longitud de oligo dT de aproximadamente 14 pb, se utilizaron en combinación con oligonucleótidos de captura que contenían una cola poli A en el extremo 3' contigua a la secuencia específica de VHA (indicada al final de la secuencia que se especifica más adelante).

Las perlas magnéticas se suspendieron en 0,4 ml de tampón de lisis TMA carente de cebador (GenProbe, San Diego, CA) y los cebadores de captura se sometieron a ensayo individualmente o en combinación. Tras la captura, las perlas se lavaron tres veces con un tampón de lavado de Hepes 10 mM (pH 7,5), NP-40 al 0,5% que contenía NaCl 0,3 M. Las perlas con el ácido nucleico capturado se suspendieron en 100 µl de reactivo de RT-PCR en una etapa TaqMan™ y se transfirieron a una placa de microtitulación de RT-PCR TaqMan™ para la detección mediante PCR TaqMan™ como se describe más adelante. Varias combinaciones de oligonucleótidos fueron eficaces en la captura de VHA tal como se detectó mediante el ensayo TaqMan™.

Los oligonucleótidos de captura utilizados fueron los siguientes (la numeración indicada al final de la secuencia corresponde a la posición dentro del genoma de VHA, con relación al número de acceso del NCBI K02990. Las secuencias de captura son secuencias complementarias inversas respecto a las posiciones especificadas, dado que el VHA es un virus de ARN de hebra codificante):

CGGCGTTGAATGGTTTTTGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAap
(nt483-503, más una cola poliA de 22 pb, p = fosforilado) (SEQ ID NO:4)

TCACCAATATCCGCCGCTGTACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAap
(nt451-474, más una cola poliA de 22 pb, p = fosforilado) (SEQ ID NO:5)

AATTTAGACTCCTACAGCTCCATGCTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAap
(nt291-319, más una cola poliA de 22 pb, p = fosforilado) (SEQ ID NO:6)

TGACCCCGCCGGGCGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAap
(264- 280, más una cola poliA de 22 pb, p = fosforilado) (SEQ ID NO:7)

GAGCCTAGGGCAAGGGGAGAGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAap
(233-255, más una cola poliA de 22 pb, p = fosforilado) (SEQ ID NO:8)

AGCCTATAGCCTAGGCAAACGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAap
(73-95, más una cola poliA de 22 pb, p = fosforilado) (SEQ ID NO:9)

Ejemplo 2

Detección de ARN de VHA mediante TaqMan™

Se utilizó la tecnología TaqMan™ para amplificar el ARN diana capturado. Para ello, los oligonucleótidos de amplificación consistieron en un cebador específico de VHA. Los cebadores fueron los siguientes:

Los cebadores de amplificación y las sondas de detección en la región no traducida 5':

VHAV1-GGATTGATTGTCAGGGCTGTC (cebador codificante-nt538-558) (SEQ ID NO:1)
VHAV2-CCCTCTCACAGGATCCCATTT (cebador no codificante-nt612-632, complementario inverso) (SEQ ID NO:2)
VHAV3-XCCTCTCTGTGCTTAGGGCAAACACCATTTZ (sonda-nt576-605) (SEQ ID NO:3)
donde X = 6-FAM (fluoresceína), y Z = conector más TAMRA (tetrametil rodamina).

El ácido nucleico del Ejemplo 1 se diluyó para obtener aproximadamente 100 IU/20 µl. Los reactivos para el análisis TaqMan™ se obtuvieron de Applied Biosystems, Foster City, CA. La mezcla de reacción TaqMan™ en un volumen final de 50 µl contenía: 25 µl de mezcla RT-PCR en una etapa TaqMan™, 0,5 pmol de cada uno de los cebadores de amplificación, y 0,2 pmol de la sonda. Las condiciones de reacción incluyeron 30 minutos a 48°C para la actividad RT, 10 minutos a 96°C para activar la enzima seguido de 45 ciclos de 30 segundos a 95°C, alternando con 30 segundos a 60°C en un detector de secuencias ABI 7900. Se utilizaron el cebador codificante VVHA1, el cebador no codificante VVHA2, y la sonda VVHA3 de amplificación por PCR.

Se preparó un transcrito testigo interno de 721 nucleótidos, Figura 4B (SEQ ID NO:17), que puede capturarse y amplificarse pero con una secuencia de unión a sonda modificada. Las letras en negrita en la secuencia que se muestra en la Figura 4B representan la secuencia en el IC que sustituye a la secuencia en la diana (Figura 4A, SEQ ID NO:16). Las secuencias de sonda ejemplares para el IC son xCAGTGACATGCAGGTCTAGCTz (SEQ ID NO:18) o xCCCAGTGACATGCAGGTCTAGCTz (SEQ ID NO:19) donde x = TET y + z = conector + TAMRA.

Ejemplo 3

Ensayo de la eficacia de amplificación y combinaciones de oligonucleótidos de captura

Se construyó mediante síntesis la secuencia de nucleótidos 5' UTR de VHA en base a la secuencia con N° de acceso del NCBI K02990. Se clonó la secuencia en plásmidos M13 para proporcionar ADN monocatenario y se purificó el ADN.

5 (a) Eficacia de amplificación

La concentración del ADN clonado y purificado se determinó por espectrofotometría y las diluciones de ADN correspondientes a 10.000 cps a 0,5 cps por reacción se amplificaron en el ensayo TaqMan™ y se detectaron utilizando los métodos, cebadores y sondas descritos anteriormente. Por lo general, las señales de las muestras producidas a <45 ciclos en un umbral de >0,2 se consideraron positivas. En la Tabla 1 se detallan los resultados.

Tabla 1

<u>cps/rxn</u>	<u>Ciclo 45</u>
0,5 cp	0,157663
1 cp	0,299065
5 cp	0,8231
10 cp	1,115975
50 cp	1,34539
100 cp	1,13805
500 cp	2,361416
1000 cp	2,478576
5000 cp	2,815369
10000 cp	2,887422
Negativo	0.072094
Negativo	0,04076

35 (b) Combinaciones de oligonucleótidos de captura

Se sometió a ensayo la eficacia de las combinaciones de captura/cebador utilizando 25 cps/ssADN de reacción. La combinación de oligonucleótidos de captura que comprende las secuencias de las SEQ ID NOS: 4, 5, 6, 7, 8 y 9 fue la más eficaz.

En consecuencia, se han descrito novedosas secuencias de VHA y ensayos de detección que utilizan estas secuencias. A partir de lo anteriormente indicado, se entenderá que, aunque en el presente documento se han descrito formas de realización específicas para fines de ilustración de la invención, pueden realizarse diversas modificaciones sin apartarse del alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Método de detección del virus de la hepatitis A (VHA) en una muestra biológica, comprendiendo el método:

- 5 aislar los ácidos nucleicos de una muestra biológica de la que sospecha que contiene VHA, en la que los ácidos nucleicos se aíslan de la muestra biológica mediante un método que comprende:
- 10 i. poner en contacto un soporte sólido que comprende ácidos nucleicos de captura asociados con el mismo con una muestra biológica en condiciones de hibridación en las que las hebras del ácido nucleico diana hibridan con los ácidos nucleicos de captura; y
- 15 ii. separar el soporte sólido de la muestra, y en el que los ácidos nucleicos de captura comprenden uno o más oligonucleótidos, en el que cada uno de los oligonucleótidos tiene una longitud no superior a aproximadamente 60 nucleótidos y comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:10, la SEQ ID NO:11, la SEQ ID NO:12, la SEQ ID NO:13 y la SEQ ID NO:14; en el que el soporte sólido comprende perlas;
- 20 amplificar los ácidos nucleicos aislados utilizando al menos dos cebadores derivados de la 5' UTR del genoma de VHA, en el que cada uno de los cebadores tienen una longitud de 10 a 60 nucleótidos y es suficientemente complementario a una porción de las hebras codificante y no codificante, respectivamente, del ácido nucleico aislado para hibridar con las mismas, y en el que
- 25 (a) uno de los cebadores comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:1 y el otro cebador comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:2, o
- 30 (b) los cebadores tienen un 90% de identidad de secuencia con las secuencias de nucleótidos descritas en (a); y
- detectar la presencia de los ácidos nucleicos amplificados como indicio de la presencia o ausencia de VHA en la muestra.
- 35 2. Método según la reivindicación 1, en el que las perlas son perlas magnéticas.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el aislamiento, la amplificación y la detección se realizan en un único recipiente.
- 40 4. Método según la reivindicación 3, en el que los ácidos nucleicos de captura comprenden adicionalmente una cadena de homopolímero en el extremo 3' o en el 5' de aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud, en el que la cadena de homopolímero está seleccionada del grupo que consiste en poliA, poliT, poliG, poliC, y poliU.
5. Método según la reivindicación 4, en el que la cadena de homopolímero es una cadena poliA.
- 45 6. Método según la reivindicación 1, en el que la amplificación comprende PCR, amplificación mediada por transcripción (TMA) o TaqMan.
7. Método según la reivindicación 6, en el que la amplificación comprende TMA.
- 50 8. Método según la reivindicación 6, que comprende adicionalmente el uso de un oligonucleótido sonda que comprende un marcador detectable para detectar la secuencia amplificada, en el que el oligonucleótido sonda tiene una longitud no superior a aproximadamente 60 nucleótidos y comprende al menos 10 nucleótidos contiguos que comprenden la SEQ ID NO:3.
- 55 9. Método según la reivindicación 8, en el que la sonda comprende marcadores detectables en el extremo 5' y en el extremo 3'.
10. Método según la reivindicación 9, en el que el marcador detectable es un marcador fluorescente seleccionado del grupo que consiste en 6-carboxifluoresceína (6-FAM), tetrametil rodamina (TAMRA), y 2',4',5',7',-tetracloro-4-7-diclorofluoresceína (TET).
- 60 11. Kit para detectar una infección por virus de la hepatitis A (VHA) en una muestra biológica, comprendiendo el kit:
- 65 capturar los ácidos nucleicos que comprenden uno o más oligonucleótidos, en los que cada uno de los oligonucleótidos tiene una longitud no superior a aproximadamente 60 nucleótidos y comprende una

- 5 secuencia de nucleótidos de al menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:10, la SEQ ID NO:11, la SEQ ID NO:12, la SEQ ID NO:13 y la SEQ ID NO:14; al menos dos cebadores que los que (a) cada uno de los cebadores tiene una longitud no superior a aproximadamente 60 nucleótidos y un cebador comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:1 y el otro cebador comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:2; instrucciones escritas para identificar la infección por VHA; y un soporte sólido que comprende perlas.
- 10 12. Kit según la reivindicación 11, que comprende adicionalmente una polimerasa y tampones.
13. Kit según la reivindicación 11, que comprende adicionalmente un oligonucleótido sonda de no más de aproximadamente 60 nucleótidos de longitud y al menos 10 nucleótidos contiguos que comprenden la SEQ ID NO:3.
- 15 14. Kit según la reivindicación 13, en el que la sonda comprende adicionalmente marcadores detectables en el extremo 5' y en el extremo 3'.
- 20 15. Kit según la reivindicación 14, en el que el marcador detectable es un marcador fluorescente seleccionado del grupo que consiste en 6-carboxifluoresceína (6-FAM), tetrametil rodamina (TAMRA), y 2',4',5',7',-tetracloro-4-7-diclorofluoresceína (TET).

FIGURA 1

- (A) GGATTGATTGTCAGGGCTGTC (SEQ ID NO: 1)
- (B) CCCTCTCACAGGATCCCATT (SEQ ID NO: 2)

FIGURA 2

XCCTCTCTGTGCTTAGGGCAAACACCATTTZ (SEQ ID NO: 3)

donde X = 6-FAM, y Z = conector más Tamra

FIGURA 3

- (A) CGGCGTTGAATGGTTTTTGTC (SEQ ID NO:10)
- (B) TCACCAATATCCGCCGCTGTTACC (SEQ ID NO:11)
- (C) AATTAGACTCCTACAGCTCCATGCTAAT (SEQ ID NO:12)
- (D) TTGACCCCGCCGGGCGC (SEQ ID NO:13)
- (E) GAGCCTAGGGCAAGGGGAGAGCC (SEQ ID NO:14)
- (F) AGCCTATAGCCTAGGCAAACGGC (SEQ ID NO:15)

```

1   ttcaagaggg gtctccggag gtttccggag cccctcttgg aagtccatgg
51  tgagggggact tgatacctca ccgccgtttg cctaggctat aggctaaatt
101 tccctttccc tgtccctccc ttatttccct ttgttttgct tgtaaatatt
151 aattcctgca gggttcaggg tctttaatct gtttctctat aagaacactc
201 aattttcacg ctttctgtct tctttcttcc agggctctcc ccttgcccta
251 ggctctggcc gttgcgccc gcgggggtcaa ctccatgatt agcatggagc
301 tgtaggagtc taaattgggg acgcagatgt ttgggacgtc acctgacagt
351 gttaacttgg ctctcatgaa cctctttgat cttccacaag gggtaggcta
401 cgggtgaaac ctcttaggct aatacttcta tgaagagatg ctttgगतag
451 ggtaacagcg gcggatattg gtgagttgtt aagacaaaaa ccattcaacg
501 ccggaggact ggctctcatc cagtggatgc attgagtgga ttgattgtca
551 gggctgtctc taggtttaat ctcagacctc tctgtgctta gggcaaacac
601 cattttggcct taaatgggat cctgtgagag ggggtccctc cattgacagc
651 tggactgttc tttggggcct tatgtggtgt ttgcctctga ggtactcagg
701 ggcatttagg tttttcctca ttcttaaaca ataatgaata tgtccaaaca
751 aggaattttc cagactgttg ggagtggcct

```

Figura 4a

```

1   ttcaagaggg gtctccggga atttccggag tccctcttgg aagtccatgg
51  tgagggggact tgatacctca ccgccgtttg cctaggctat aggctaaatt
101 tcccttttcc cttttccctt tcctattccc tttgttttgc ttgtaaatat
151 taattcctgc aggttcaggg ttcttaaate tgtttctcta taagaacact
201 cattttttcac gctttctgtc ttctttcttc cagggtcttc cccttgccct
251 aggcctctggc cgttgcgccc ggccgggtca actccatgat tagcatggag
301 ctgtaggagt cttaaattggg gacacagatg tttggaacgt caccttgacg
351 tgtttaacttg gctttcatga atctctttga tcttccacaa ggggtaggct
401 acgggtgaaa cctcttaggc taatacttct atgaagagat gccttgata
451 gggtaacagc ggcggatatt ggtgagttgt taagacaaaa accattcaac
501 gccggaggac tgactctcat ccagtggatg cattgagtgg attgactgtc
551 agggctgtct ttaggcttaa ttccagagcc cagtacatg caggtctagc
601 tccgggcctt aaatgggatt ctgtgagagg ggatccctcc attgacagct
651 ggactgttct ttggggcctt atgtggtgtt tgctctctgag gtactcaggg
701 gcatttagtc gacctgcagg catgcaa

```

Figura 4b