

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 729**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2008** **E 08727296 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012** **EP 2142926**

54 Título: **Composiciones y métodos de detección**

30 Prioridad:

05.04.2007 US 910381 P
05.04.2007 US 910373 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.05.2013

73 Titular/es:

GENERA BIOSYSTEMS LIMITED (100.0%)
1 DALMORE DRIVE
SCORESBY, VICTORIA 3179, AU

72 Inventor/es:

PARK, DANIEL J.;
KHAN, ZAHEER y
POETTER, KARL F.

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 403 729 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos de detección

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, al campo de ensayos de diagnóstico y detección. Más en particular, la presente invención proporciona métodos y reactivos incluidos biochips para detectar la presencia de, o distinguir entre, uno o más analitos en una muestra.

10

Antecedentes de la invención

Los detalles bibliográficos de referencias proporcionadas en la memoria descriptiva objeto se enumeran al final de la memoria descriptiva.

15

Las referencias a cualquier técnica anterior en esta memoria descriptiva no son, y no deberían considerarse como, un reconocimiento de ninguna forma de sugerencia de que la técnica anterior forma parte del saber popular en ningún país.

20

La necesidad de métodos de cribado rápidos y fiables para detectar múltiples analitos en un ensayo individual es vital no sólo en los campos de diagnóstico clínico sino también para su uso en el cribado, por ejemplo, para el cribado de fármacos y toxinas ambientales.

25

Un área de este tipo que necesita urgentemente métodos de cribado mejorados y reactivos está en el campo de las enfermedades infecciosas. Por ejemplo, una estimación conservadora del uso mundial de pruebas de diagnóstico para enfermedades de transmisión sexual, tales como el virus del papiloma humano (VPH), es de aproximadamente 20.000.000 pruebas por año.

30

Muchas de las pruebas existentes para el cribado de las causas de las enfermedades infecciosas consumen tiempo, son laboriosas, caras, a menudo específicas sólo para un patógeno y/o no pueden diferenciar entre diferentes cepas de patógenos.

35

El VPH es el principal patógeno causante de cáncer cervical. Sin embargo, el taxón del VPH comprende muchas "cepas" del patógeno, de las que sólo algunas están asociadas con el desarrollo de cáncer cervical y otros carcinomas. En consecuencia, las cepas de VPH se clasifican típicamente como cepas de "alto riesgo", incluidas las 13 cepas que representan aproximadamente el 98 % de los casos de cáncer cervical, o cepas de "bajo riesgo" que no están típicamente asociadas con el desarrollo de cáncer cervical. El documento WO 2006/060872 A1 divulga un ensayo para el VPH en sujetos humanos para la diferenciación entre taxones del VPH para distinguir infecciones por VPH de "alto riesgo" de las infecciones de "bajo riesgo".

40

Actualmente, el cáncer cervical se detecta por un frotis de Papanicolaou. En esta técnica, se recogen células del cérvix por raspado o lavado. A continuación, estas células se sitúan sobre un portaobjetos de microscopio de vidrio para producir el "frotis". Después, un patólogo examina el portaobjetos, buscando células aberrantes. El frotis de Papanicolaou, sin embargo, es de algún modo un ensayo no satisfactorio para determinar de forma inequívoca un riesgo de cáncer cervical, ya que la técnica tiene una tasa de falso negativo de aproximadamente el 20 % y la técnica no puede distinguir el taxón de "alto riesgo" y de "bajo riesgo".

45

Muchos de los reactivos y/o métodos para la detección del VPH sufren de altos costes asociados y/o consumen cantidades significativas de tiempo hasta su terminación. Se necesitan análisis más rápidos y/o simplificados con menores costes globales y una aplicación más fácil. La presente invención se refiere a estos y otros fines importantes.

50

Sumario de la invención

55

La presente invención proporciona ensayos que permiten la detección de uno o más analitos y/o que diferencian entre miembros dentro de una clase de analitos. En particular, se emplea un análisis de multiplexación basado en las propiedades de los analitos y de los componentes del ensayo para identificar o distinguir entre analitos.

60

En consecuencia, determinados aspectos de la presente invención proporcionan conjuntos de perlas para detectar uno o más analitos y/o para diferenciar entre dos o más miembros dentro de una clase de analitos, en los que el conjunto de perlas comprende una pluralidad de familias o subconjuntos de perlas en el que:

(a) las perlas de cada subconjunto son homogéneas con respecto al tamaño;

65

(b) las perlas dentro de cada subconjunto se acoplan a un reactivo que reaccionará específicamente con un analito de interés dado en una muestra que se va a probar;

(c) el reactivo sobre cada perla se marca con la misma marca con cada subconjunto de perlas que tienen una intensidad fluorescente diferente para crear una mezcla heterogénea de subconjuntos de perlas basada en la intensidad fluorescente; y

5 (d) al menos dos subconjuntos de perlas se mezclan juntas para producir un conjunto de perlas, en el que la identidad del subconjunto y por lo tanto el reactivo al que se ha acoplado la perla se puede identificar por citometría de flujo en base al tamaño, intensidad fluorescente y discriminación de analitos.

10 En otros aspectos, la presente invención contempla métodos in vitro para detectar y/o diferenciar entre dos o más analitos en una muestra, que comprenden las etapas de:

(a) poner en contacto la muestra con un conjunto de perlas específicas para los analitos de interés;

15 (b) incubar dicho conjunto de perlas con dicha muestra durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir que dicho(s) analito(s) en dicha muestra reacciones específicamente con un reactivo sobre una perla dentro de dicho conjunto de perlas; y

20 (c) detectar y/o diferenciar analitos en la muestra que se unen a un reactivo sobre dicha perla.

En algunos otros aspectos, los reactivos se pueden marcar con uno o más fluorocromos que permiten adicionalmente la diferenciación entre miembros dentro de una clase de analitos. En determinados aspectos preferidos, la presente invención proporciona métodos y conjuntos de perlas que pueden detectar y/o distinguir entre analitos dentro de una muestra biológica, en los que los analitos son específicos para un patógeno infeccioso.

25 Las muestras biológicas contempladas en el presente documento incluyen sangre, suero, saliva, heces, orina, fluido tisular, semen, exudado, pus y fluido respiratorio y moco y frotis de llagas, cánceres y lesiones tóxicas.

30 El término "patógeno" se refiere a un microorganismo o virus que infecta o coloniza una muestra. Los patógenos ejemplares incluyen virus, bacterias, hongos y microorganismos eucariotas. Un virus incluye un Lentivirus (por ejemplo virus del sida, VIH-I, VIH-II, HTLV-IV), Retrovirus y virus de la gripe aviar. En algunas realizaciones preferidas, "patógeno" incluye un microorganismo o virus que infecta un organismo multicelular tal como un animal o una planta. En consecuencia, en algunas realizaciones, el analito se puede considerar como un patógeno de animal o de planta. Sin embargo, la presente invención engloba la detección y/o diferenciación de entidades no patógenas que colonizan organismos multicelulares tales como simbioses, endófitos, colonizadores gastrointestinales, y similares. Los métodos de la presente invención también son aplicables a la detección de analitos en una muestra que sea indicativa de la presencia de agentes terapéuticos o sustancias de abuso. Los métodos y reactivos de la presente invención también se pueden usar en la detección de un analito en una muestra que no se deriva de una muestra biológica aislada a partir de un animal o una planta. Como tales, los reactivos y métodos de la presente invención también se extienden a la detección de uno o más analitos y/o diferenciación entre analitos en muestras ambientales, incluidas muestras de aire, agua y tierra, incluidas muestras extraterrestres de tierra, polvo o similar, muestras industriales y similares, además de las muestras biológicas enumeradas anteriormente.

45 En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona métodos in vitro de diagnóstico y reactivos para VPH en sujetos humanos y puede detectar y diferenciar entre cepas diferentes para distinguir un taxón del VPH de "alto riesgo" de un taxón del VPH de "bajo riesgo". En consecuencia, en algunas realizaciones preferidas, la presente invención proporciona conjuntos de perlas que pueden distinguir entre pluralidades de cepas de VPH diferentes. Como tales, en un aspecto, los analitos son específicos para una pluralidad de taxones del VPH y los métodos y/o reactivos son específicos para la detección de ácido nucleico o antígenos o anticuerpos que sean específicos para la pluralidad de taxones del VPH.

50 Aún más preferido, los cebadores o sondas de ácido nucleico que se pueden unir a una porción específica de cepa de un genoma del VPH se inmovilizan sobre perlas en cada subconjunto de perlas. Los cebadores dirigidos a regiones conservadas dentro de un genoma del VPH que flanquea una región específica de cepa se usan a continuación para amplificar el genoma del VPH. Las familias de perlas o subconjuntos de perlas, cada una para una cepa cualquiera del VPH se usan a continuación para detectar o distinguir la cepa del VPH.

60 Otros aspectos de la presente invención se refieren conjuntos de perlas para detectar una o más cepas del VPH y/o para diferenciar entre dos o más cepas del VPH, en los que el conjunto de perlas comprende una pluralidad de familias o subconjuntos de perlas en las que:

(a) las perlas de cada subconjunto son homogéneas con respecto al tamaño;

65 (b) las perlas dentro de cada subconjunto se acoplan a una sonda de captura de ácido nucleico que se puede unir a una región específica de cepa del VPH de un genoma del VPH u, opcionalmente, una secuencia de ácidos nucleicos de control;

(c) la sonda de captura sobre cada perla se marca con la misma marca con cada subconjunto de perlas que tienen una intensidad fluorescente diferente para crear una mezcla heterogénea de perlas basada en la intensidad fluorescente; y

(d) al menos dos subconjuntos de perlas se mezclan juntas para producir un conjunto de perlas, en el que la identidad del subconjunto y por lo tanto la cepa del VPH se puede identificar por citometría de flujo en base al tamaño, intensidad fluorescente y discriminación de secuencias.

Otros aspectos de la presente invención contemplan métodos in vitro para detectar y/o diferenciar entre dos o más cepas del VPH en una muestra, que comprenden las etapas de:

(a) poner en contacto la muestra con un conjunto de perlas que comprenden una pluralidad de familias o subconjuntos de perlas en las que:

(i) las perlas de cada subconjunto son homogéneas con respecto al tamaño,

(ii) las perlas dentro de cada subconjunto se acoplan a una sonda de captura de ácido nucleico que se puede unir a una región específica de cepa del VPH de un genoma del VPH u, opcionalmente, una secuencia de ácidos nucleicos de control,

(iii) la sonda de captura sobre cada perla se marca con la misma marca con cada subconjunto de perlas que tienen una intensidad fluorescente diferente para crear una mezcla heterogénea de perlas basada en la intensidad fluorescente, y

(iv) al menos dos subconjuntos de perlas se mezclan juntas para producir un conjunto de perlas, en el que la identidad del subconjunto y por lo tanto la cepa del VPH se puede identificar por citometría de flujo en base al tamaño, intensidad y discriminación de secuencias;

(b) incubar dicho conjunto de perlas con dicha muestra durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir que dichas sondas se unan al genoma del VPH amplificado para generar un replicón que comprende una región específica de cepa;

(c) detectar y/o diferenciar los amplicones generados en la muestra que se unen a dichas perlas para, de este modo, identificar o distinguir entre las dos o más cepas de VPH.

En algunos aspectos preferidos, las perlas dentro de los conjuntos de perlas se pueden distinguir en base al tamaño, al nivel de intensidad fluorescente, al tipo de fluorocromo y al reactivo que puede reaccionar con un analito específico.

En otros aspectos, la presente invención se refiere a conjuntos de perlas para detectar una cepa del VPH y/o para diferenciar entre dos o más cepas del VPH, en los que el conjunto de perlas comprende una pluralidad de familias o una pluralidad de subconjuntos de perlas que tienen:

(a) al menos dos subconjuntos de perlas, en los que cada subconjunto de perlas se puede distinguir fisicoquímicamente de cualquier otro subconjunto de perlas en base, al menos, al tamaño, o

(b) al menos un subconjunto de perlas que tienen al menos dos familias, en el que las perlas en un subconjunto de perlas son homogéneas en tamaño unas con respecto a otras, y se pueden distinguir fisicoquímicamente en dos o más familias de perlas en base al nivel de marcado que contiene cada una, o

(c) una combinación de dichas familias de perlas y dichos subconjuntos de perlas;

y en los que:

las perlas dentro de cada familia de perlas de un subconjunto se acoplan cada una a una sonda de captura de ácido nucleico opcionalmente marcada que se puede unir a una región del VPH específica de cepa de un genoma del VPH u, opcionalmente, al menos a una de una secuencia de ácido nucleico de control, siempre que cualquier sonda de captura de ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico de control esté marcada con la misma marca que otras sondas de captura o secuencia de ácido nucleico de control marcadas en el subconjunto de perlas, y que dentro de cualquier subconjunto de perlas individual, cada familia de perlas del mismo tenga una intensidad fluorescente diferente, en los que la sonda de captura de ácido nucleico se selecciona de SEQ ID NO:46-63 y en los que la región específica de cepa del VPH de un genoma del VPH es un amplicón generado amplificando ácido nucleico a partir de una muestra biológica que se ha obtenido de un sujeto humano, que comprende putativamente VPH, en los que el amplicón es distinto de dicho VPH o una cepa particular de dicho VPH, y en los que el amplicón se genera usando un par de cebadores de amplificación de oligonucleótidos de un cebador directo y un cebador inverso, en los que el

cebador directo del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:1-8, y el cebador inverso del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:9-12, y en los que al menos uno de los cebadores directos o inversos está conjugado a una protuberancia en el extremo 5' terminal del cebador; y

5 en los que cada familia de perlas es específica para la detección de una cepa de VPH diferente de cualquier otra familia de perlas en el conjunto de perlas; en los que dicho conjunto de perlas puede identificar una o más cepas de VPH específicas por medio de análisis del tamaño de perla, intensidad fluorescente, o discriminación de secuencias de la al menos una familia de perlas o subconjunto de perlas, usando citometría de flujo.

10 La invención también se refiere en parte a métodos para preparar un conjunto de perlas para diferenciar entre dos o más cepas de VPH, comprendiendo el método seleccionar una pluralidad de familias o subconjuntos de perlas en base al tamaño, intensidad fluorescente, o ambos, que comprende proporcionar:

15 (a) al menos dos subconjuntos de perlas, en los que cada subconjunto de perlas se puede distinguir fisicoquímicamente de cualquier otro subconjunto de perlas en base, al menos, al tamaño, o

(b) al menos un subconjunto de perlas que tienen al menos dos familias, en el que las perlas en un subconjunto de perlas son homogéneas en tamaño unas con respecto a otras, y se pueden distinguir fisicoquímicamente en dos o más familias de perlas en base al nivel de marcado que contiene cada una, o

20 (c) una combinación de dichas familias de perlas y dichos subconjuntos de perlas;

y en los que:

25 las perlas dentro de cada familia de perlas de un subconjunto se acoplan cada una a una sonda de captura de ácido nucleico opcionalmente marcada que se puede unir a una región del VPH específica de cepa de un genoma del VPH u, opcionalmente, al menos a una de una secuencia de ácido nucleico de control, siempre que cualquier sonda de captura de ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico de control esté marcada con la misma marca que otras sondas de captura o secuencia de ácido nucleico de control marcadas en el subconjunto de perlas, y que dentro de cualquier subconjunto de perlas individual, cada familia de perlas del mismo tenga una intensidad fluorescente diferente, en los que la sonda de captura de ácido nucleico se selecciona de SEQ ID NO:46-63 y en los que la región específica de cepa del VPH de un genoma del VPH es un amplicón generado amplificando ácido nucleico a partir de una muestra biológica que se ha obtenido de un sujeto humano, que comprende putativamente VPH, en los que el amplicón es distinto de dicho VPH o una cepa particular de dicho VPH, y en los que el amplicón se genera usando un par de cebadores de amplificación de oligonucleótidos de un cebador directo y un cebador inverso, en los que el cebador directo del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:1-8, y el cebador inverso del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:9-12, y en los que al menos uno de los cebadores directos o inversos está conjugado a una protuberancia en el extremo 5' terminal del cebador; y

40 en los que cada familia de perlas es específica para la detección de una cepa de VPH diferente de cualquier otra familia de perlas en el conjunto de perlas; en los que dicho conjunto de perlas puede identificar una o más cepas de VPH específicas por medio de análisis del tamaño de perla, intensidad fluorescente, o discriminación de secuencias de la al menos una familia de perlas o subconjunto de perlas, usando citometría de flujo.

45 Se pueden usar los métodos de la presente invención con relación a la detección del VPH para distinguir de entre 2 y 16 cepas de VPH incluidas de entre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 cepas. Por lo tanto, en vista de la utilidad de un control, la presente invención puede usar desde 2-17 perlas o conjuntos de perlas diferentes. En otra realización, el conjunto de perlas comprende al menos 16 subconjuntos de perlas para las cepas del VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68, y típicamente un conjunto de perlas de control. Las sondas de captura adecuadas son las enumeradas en la tabla 2.

50 Puede ser deseable probar más de 16 cepas de un analito. Por, la presente invención también incluye conjuntos de perlas con 2-30 perlas o conjuntos de perlas diferentes, incluidas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, y 30 perlas o conjuntos de perlas.

55 La presente invención se refiere en parte a determinados pares de cebadores para su uso en cualquiera de las numerosas técnicas de PCR para la amplificación de secuencias de ácido nucleico, en los que al menos uno de los cebadores directos e inversos está conjugado a una protuberancia en el extremo 5' terminal del cebador. También se divulgan pares de cebadores de amplificación de oligonucleótidos para dirigir el VPH oncogénico, el cebador directo del par, seleccionado del grupo que consiste en:

TR TTT GTT ACT GTK GTD GAT ACY A; (SEQ ID NO:1)

CAR YTR TTT GTT ACT GTK GTD GAT A; (SEQ ID NO:2)

65 CAR YTR TTT GTT ACT GTK GTD GA; (SEQ ID NO:3)

AAV CAR YTR TTT GTT ACT GTK GT; (SEQ ID NO:4)

TTT GTT ACT GTK GTD GAT ACY AC HCG; (SEQ ID NO:5)

TTT GTT ACT GTK GTD GAT ACY AC HCG YAG; (SEQ ID NO:6) GTK GTD GAT ACY AC HCG YAG TAC y (SEQ ID NO:7)

GTD GAT ACY AC HCC YAG TAC HAA; (SEQ ID NO:8)

y el cebador inverso del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en:

TGA AAA ATA AAY TGY AAA TCA TAT TCY TCM MCA TG; (SEQ ID NO:9)

CAY ARY TGA AAA ATA AAY TGY AAA TC; (SEQ ID NO:10)

TR CAY ARY TGA AAA ATA AAY TG; y (SEQ ID NO:11)

TR CAY ARY TGA AAA ATA AA; (SEQ ID NO:12)

en los que al menos uno de los cebadores directos e inversos está conjugado con una protuberancia en el extremo 5' terminal del cebador.

La determinación de si se ha producido la unión entre un analito y un reactivo presente sobre una perla se puede realizar usando cualquier metodología que permita la diferenciación entre diferentes perlas dentro del conjunto de perlas. En determinadas realizaciones particularmente preferidas, los métodos de diferenciación entre diferentes perlas dentro de los conjuntos de perlas utilizan citometría de flujo.

También se divulgan kits de diagnóstico para su uso de acuerdo con los reactivos y métodos de la presente invención. En particular, se divulgan biochips y la miniaturización de los componentes de fase sólida del ensayo para generar reactivos de nanoensayo. Además, el conjunto de perlas o parte del mismo u otros reactivos se inmovilizan a una fase sólida tal como un biochip. El biochip también se puede considerar como un "biolab" sobre el que se realiza al menos parte del ensayo y/o se registran los resultados.

Se proporciona una lista de abreviaturas usadas en el presente documento en la tabla 1.

Tabla 1- Abreviaturas

Abreviatura	Descripción
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HEX	Hexaclorofluoresceína
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del papiloma humano
JOE	7'-dimetoxifluoresceína
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PMT	Tubo fotomultiplicador
QD	Punto cuántico
TAMRA	Carboxitetrametilrodamina
TET	Tetraclorofluoresceína
TMR	Tetrametilrodamina
VRE	Enterococcus resistentes a ancomicina

Se muestra un resumen de las secuencias usadas en el presente documento en la tabla 2.

Tabla 2 - Secuencias (estando 5' a la izquierda, 3' a la derecha)		SEQ ID NO:
Secuencias de cebadores de PCR		
GP5+	TTTGTACTGTGGTAGATACTAC	13
GP6+	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C	14
GP5d+	TTTKTTACHGTKGTDGATACYAC	15
GP6d+	GAAAHATAAAAYTGYAADTCATAYTC	16
GP5+ (5Phos)	/5Phos/TTTGTACTGTGGTAGATACTAC	17
GP6+ (5AmMC6)	/5AmMC6/GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C	18
GP5d+(5Phos)	/5Phos/TTTKTTACHGTKGTDGATACYAC	19
GP6d+(5AmMC6)	/5AmMC6/GAAAHATAAAAYTGYAADTCATAYTC	20
GP5d2+	TTT KTT ACH GTK GTD GAT ACH AC - 3'	21
T7aGP6d+ (HeelGP6d+)	AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA AAH ATA AAY TGY AAD TCA TAY TC	22
GP5d3+	TTT GTT ACH GTD GTD GAY ACH AC	23
T7aGP6d+*(HeelGP6d+)	AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA AAH ATA AAY TGY ARD TCA WAY TC	24
GP5d2+ (5Phos)	/5Phos/TTT KTT ACH GTK GTD GAT ACH AC - 3'	25
T7aGP6d+ (HeelGP6d+)	/5AmMC6/AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA AAH ATA AAY TGY AAD TCA TAY TC	26
GP5d3+ (5Phos)	5Phos TTT GTT ACH GTD GTD GAY ACH AC	27
T7aGP6d+* (5AmMC6)	/5AmMC6/AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA AAH ATA AAY TGY ARD TCA WAY TC	28
mlc1_95f	GGC ACC CAG ACA ATA CAC	29
T7amlc1_275r (HeelMLCR)	AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GTA AGT TGA AGA GGT GAA GAA	30
mlc1_95f (5Phos)	/5Phos/GGC ACC CAG ACA ATA CAC	31
T7amlc1_275r (HeelMLCR) (5AmMC6)	/5AmMC6/AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GTA AGT TGA AGA GGT GAA GAA	32
GBHPVf1	/5Phos/caatcagg TR TTT GTT ACT GTK GTD GAT ACY A	33
GBHPVf2	/5Phos/acaat CAR YTR TTT GTT ACT GTK GTD GAT A	34
GBHPVf3	/5Phos/acaat CAR YTR TTT GTT ACT GTK GTD GA	35

SEQ ID NO:		
GBHPVf3+	36	/5Phos/ <u>ggaacaa</u> CAR YTR TTT GTT ACT GTK GTD GA
GBHPVf4	37	/5Phos/ <u>ggaac</u> AAY CAR YTR TTT GTT ACT GTK GT
GBHPVf5	38	/5Phos/ <u>cagctt</u> TTT GTT ACT GTK GTD GAT ACY AC HCG
GBHPVf6	39	/5Phos/ <u>cagctt</u> TTT GTT ACT GTK GTD GAT ACY AC HCG YAG
GBHPVf7	40	/5Phos/ <u>attacc</u> GTK GTD GAT ACY AC HCG YAG TAC
GBHPVf8	41	/5Phos/ <u>ctgtt</u> GTD GAT ACY AC HCG YAG TAC HAA
GBHPVr1	42	/5AmMC6/ <u>actcactatagg</u> TGA AAA ATA AAY TGY AAA TCA TAT TCY TCM MCA TG
GBHPVr2	43	/5AmMC6/ <u>aatacagactcactatagg</u> CAY ARY TGA AAA ATA AAY TGY AAA TC
GBHPVr3	44	/5AmMC6/ <u>tctaatacagactcactatagg</u> TR CAY ARY TGA AAA ATA AAY TG
GBHPVr4	45	/5AmMC6/ <u>aattctaatacagactcactatagg</u> TR CAY ARY TGA AAA ATA AA

Secuencias de sonda de captura		
Sonda 6:	46	/5Acryd/AAT /iAmMC6T/AA AGG GAG GAC AGC TAT GGA CAT CCG TAA CTA CAT CTT CCA CAT ACA CCA A
Sonda 11:	47	/5Acryd/AAT /iAmMC6T/AA AGG GAG GAC AGC TAT GGA CAT CTG TGT CTA AAT CTG CTA CAT ACA CTA A
Sonda 16:	48	/5Acryd/AAT /iAmMC6T/AA AGG GAG GAC AGC TAT GGA CGT CAT TAT GTG CTG CCA TAT CTA CTT CAG A
Sonda 18b:	49	/5Acryd/AAT /iAmMC6T/AA AGG GAG GAC AGC TAT GGA CC TCC TGT ACC TGG GCA ATA TGA TGC TAC CA
Sonda 31:	50	/5Acryd/AAT /iAmMC6T/AA AGG GAG GAC AGC TAT GGA CTG TTT GTG CTG CAA TTG CAA ACA GTG ATA C
Sonda 33:	51	/5Acryd/AAT /iAmMC6T/AA AGG GAG GAC AGC TAT GGA CTT TAT GCA CAC AAG TAA CTA GTG ACA GTA C
Sonda 35:	52	/5Acryd/AAT /iAmMC6T/AA AGG GAG GAC AGC TAT GGA CGT CTG TGT GTT CTG CTG TGT CTT CTA GTG A
Sonda 39:	53	/5Acryd/AAT /iAmMC6T/AA AGG GAG GAC AGC TAT GGA CTC TAC CTC TAT AGA GTC TTC CAT ACC TTC T

	SEQ ID NO:	
Sonda 45:	54	/5Acryd/AAT /iAmMC6T/AA AGG GAG GAC AGC TAT GGA CAC ACA AAA TCC TGT GCC AAG TAC ATA TGA C
Sonda 51:	55	/5Acryd/AAT /iAmMC6T/AA AGG GAG GAC AGC TAT GGA CAG CAC TGC CAC TGC TGC GGT TTC CCC AAC A
Sonda 52:	56	/5Acryd/AAT /iAmMC6T/AA AGG GAG GAC AGC TAT GGA CTG CTG AGG TTA AAA AGG AAA GCA CAT ATA A
Sonda 56:	57	/5Acryd/AAT /iAmMC6T/AA AGG GAG GAC AGC TAT GGA CGT ACT GCT ACA GAA CAG TTA AGT AAA TAT G
Sonda 58b:	58	/5Acryd/AAT /iAmMC6T/AA AGG GAG GAC AGC TAT GGA CG CAC TGA AGT AAC TAA GGA AGG TAC
Sonda 59:	59	/5Acryd/AAT /iAmMC6T/AA AGG GAG GAC AGC TAT GGA CTC TAC TAC TTC TTC TAT TCC TAA TGT ATA C
Sonda 66:	60	/5Acryd/AAT /iAmMC6T/AA AGG GAG GAC AGC TAT GGA CTA TTA ATG CAG CTA AAA GCA CAT TAA CTA A
Sonda 68:	61	/5Acryd/AAT /iAmMC6T/AA AGG GAG GAC AGC TAT GGA CTC TAC TAC TAC TGA ATC AGC TGT ACC AAA T
Sonda 68b:	62	/5Acryd/AAT /iAmMC6T/AA AGG GAG GAC AGC TAT GGA CT CCA CTA CTA CAG ACT CTA CTG TAC CA
Sonda 4MLC_Int:	63	/5Acryd/AAT /iAmMC6T/AA AGG GAG GAC AGC TAT GGA CCA AAC ACA GAC ACA GAG AGA CCC ACA GAC A

Secuencias de oligo de bloque*		
bloque6/4:	64	TTG GTG TAT GTG GAA GA GTA GTG ACG GAT
bloque11/4:	65	TTA GTG TAT GTG GCA GA TTA GAG ACA GAT
bloque16/4:	66	TCT GAT GTA GAA ATG GCG GCA CA AAT GAC
bloque18b/4:	67	TGG TAG CAT CA ATT GCG CAG GTG CAG GAG
bloque31/4:	68	GTA TCG CTG TTA GCA ATA GCA GCG GAA ACA
bloque33/4:	69	GTA CTC TCA CTT GTT ACA TGT GTG CAT AAA
bloque35/4:	70	TCA CTT GAA GAG ACA GCG GAA CAG ACA GAC
bloque39/4:	71	AGA AGC TAT GGT AGA CTC TAT AGT GGT AGA
bloque45/4:	72	GTC ATT TGT ACA TGG CAG AGG ATA TTG TGT
bloque51/4:	73	TGT TCG GGA AAG CGC AGC AGT GGC AGT GCT
bloque52/4:	74	TTA TAA GTG CTA TCC TTA TTA ACC TCA GCA
bloque56/4:	75	CAT ATA TAC TTT ACT GTG CTG TAG CAG TAC
bloque58b/4:	76	TA CCA TCC TTT GTT ACA TCA GTG C
bloque59/4:	77	GTA TAG ATT AGC AAT AGT AGA ACA AGT AGA
bloque66/4:	78	TTA GTG AAT GTG CTT TTT GCT GCG TTA ATA
bloque68/4:	79	ATT TGC TAC AGC TGA TTT AGT AGA AGT AGA
bloque68b/4:	80	TGG TAG AGT AGT GTC TGA AGT AGA GGA
bloqueMLC/4:	81	TGT CTC TGG GTG TCT CTC TGT CTC TGT TTG

*En las que las bases sombreadas corresponden a las diferencias.

Secuencias de oligos de señal		
Señal HPV a:	82	/5AmMC6/TTT TTT CAT GKK GAR GAR TAT GA/3Phos/
Señal HPV b:	83	/5AmMC6/TTT TTT CAT GKK GAR GAR TAT /3Phos/
Señal MLC a:	84	/5AmMC6/TTT TTT ACA GAC ACA GAC AAC /3Phos/
Señal MLC b:	85	/5AmMC6/TTT TTT ACA GAC ACA GAC AAC A/3Phos/
Señal MLC c:	86	/5AmMC6/TTT TTT ACA GAC ACA GAC AAC AC/3Phos/

5

Se usan las siguientes variables en el presente documento:

"K" es una variable para G o T;

10 "H" es una variable para los nucleótidos T, A o C;

"M" es una variable para los nucleótidos A o C;

"Y" es una variable para los nucleótidos T o C;

15

"R" es una variable para los nucleótidos A o G;

"W" es una variable para los nucleótidos A o T;

20 "D" es una variable para los nucleótidos A, T o G;

3Phos es un grupo fosfato 3';

5Phos es un grupo fosfato 5'; y,

- 5 5AmMC6 es un grupo $H_2N-(CH_2)_6$ 5' unido por medio de un grupo fosfato.

Breve descripción de las figuras

10 La figura 1 es una representación gráfica que muestra un esquema de un ejemplo de un protocolo de extracción de ADN usado en el método de diagnóstico del VPH.

15 La figura 2 es una representación gráfica que muestra un protocolo de PCR que se puede usar para amplificar VPH y ADN humano a partir de una muestra de ADN. GP5+ y GP6+ se refiere a cebadores de VPH universales que se unen a secuencias conservadas (Y) en el VPH y generan un amplicón que comprende una región que es variable entre cepas del VPH (X_{1-16}). Los cebadores LC1_F y LC1_R amplifican una región de ADN genómico humano (Z) que sirve como control en las etapas de hibridación posteriores. Los cebadores GP6+ y LC1_R comprenden una marca fluorescente que se incorpora en el amplicón generado.

20 La figura 3 es una representación gráfica que muestra la diferenciación de microesferas en base al tamaño. Se muestran seis clústeres que corresponden a microesferas que comprenden diámetros de 3,0 μm , 3,5 μm , 4,1 μm , 5,0 μm , 5,6 μm y 6,8 μm .

25 La figura 4 es una representación gráfica que muestra la diferenciación de microesferas del mismo tamaño en base a la intensidad de marca fluorescente. Se pudieron distinguir claramente intensidades relativas de TMR del 0 %, 4 %, 20 % y 100 %.

30 La figura 5 es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de los agentes de unión que se pueden usar en la matriz. La matriz comprende microesferas que comprenden diámetros de 3,0 μm , 3,5 μm , 4,1 μm , 5,0 μm , 5,6 μm y 6,8 μm e intensidades de señal de marca fluorescentes del 0 %, 4 %, 20 % y 100 %. En el caso de los tamaños de perlas más pequeño, es decir, 3,0 μm , 3,5 μm y 4,1 μm , se usaron intensidades de TMR del 0 % y 100 %; para las microesferas de 5,0 μm se usaron intensidades de TMR del 0 %, 20 % y 100 %; y para las microesferas más grandes, de diámetro 5,6 μm y 6,8 μm , se usaron todas las intensidades de señal.

35 La figura 6 muestra un ejemplo de un conjunto de perlas de la presente invención.

La figura 7 es una representación gráfica que muestra un ejemplo de la matriz de agente de unión al que se ha unido un amplicón. Los resultados muestran la unión a la secuencia conservada vírica, Y, la secuencia de control humana Z, y la secuencia específica de cepa vírica X_{16} .

40 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona ensayos y reactivos que permiten la detección de uno o más analitos y/o la diferenciación entre miembros dentro de una clase de analitos. En particular, los analitos se identifican o se distinguen por métodos in vitro de análisis de multiplexación en base a las propiedades de los analitos y de los componentes de ensayo. Los ensayos de diagnóstico y detección y los reactivos de la presente invención tienen una aplicación particular en el diagnóstico de infecciones por patógenos en sujetos eucariotas multicelulares. En una realización particular, la presente invención proporciona un ensayo de diagnóstico para el VPH en sujetos humanos y puede diferenciar entre taxones del VPH para distinguir infecciones por VPH de "alto riesgo" de infecciones por VPH de "bajo riesgo". Además, la presente invención también proporciona métodos in vitro de diagnóstico o evaluación del riesgo de desarrollo de una enfermedad asociada con una infección por un analito en un sujeto eucariota multicelular incluida entre otras, cáncer cervical en un sujeto humano.

55 Se debe entender que a menos que se establezca de otro modo la invención objeto no está limitada a protocolos de ensayo o de diagnóstico específicos, ya que estos pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en el presente documento es para el propósito de describir realizaciones particulares.

60 Cabe destacar que, como se usa en la memoria descriptiva objeto, las formas del singular "un", "uno" y "el" incluyen aspectos plurales a menos que el contexto ya establezca lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un analito" incluye un único analito así como dos o más analitos; un "sustrato que se puede distinguir fisicoquímicamente" incluye un único sustrato así como dos o más sustratos; la referencia a "una diana" incluye una única diana, así como dos o más dianas; la referencia a "una amplificación" incluye una única amplificación, así como múltiples etapas de amplificación; la referencia a "el amplicón" incluye un único amplicón o múltiples amplicones o amplicones complejos; y así sucesivamente.

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención proporciona conjuntos de perlas que pueden detectar, y/o diferenciar entre dos o más analitos en una muestra, comprendiendo dichos conjuntos de perlas:

(a) las perlas de cada subconjunto son homogéneas con respecto al tamaño,

(b) las perlas dentro de cada subconjunto se acoplan a un reactivo que reaccionará específicamente con un analito de interés dado en una muestra que se va a probar,

(c) el reactivo sobre cada perla se marca con la misma marca con cada subconjunto de perlas que tienen una intensidad fluorescente diferente para crear una mezcla heterogénea de subconjuntos de perlas basada en la intensidad fluorescente, y

(d) al menos dos subconjuntos de perlas se mezclan juntas para producir un conjunto de perlas;

en los que la identidad del subconjunto y por lo tanto el reactivo al que se ha acoplado la perla se puede identificar por citometría de flujo en base al tamaño, intensidad fluorescente y discriminación de analitos.

En algunas realizaciones, adicionalmente, los reactivos pueden estar marcados diferencialmente para crear subpoblaciones adicionales de perlas en base a la incorporación de diferentes fluorocromos.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona métodos o conjuntos de perlas para la detección y/o diferenciación de un analito.

En determinados aspectos preferidos, los métodos o conjuntos de perlas de la presente invención pueden detectar y/o diferenciar analitos patogénicos.

en los que la sonda de captura de ácido nucleico se selecciona de SEQ ID NO:46-63; y en los que la región específica de cepa del VPH de un genoma del VPH es un amplicón generado amplificando ácido nucleico a partir de una muestra biológica que se ha obtenido de un sujeto humano, que comprende putativamente VPH, en los que el amplicón es distinto para dicho VPH o una cepa particular de dicho VPH, y en los que el amplicón se genera usando un par de cebadores de amplificación de oligonucleótidos de un cebador directo y un cebador inverso, en los que el cebador directo del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:1-8, y el cebador inverso del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:9-12, y en los que al menos uno de los cebadores directos e inversos está conjugado a una protuberancia en el extremo 5' terminal del cebador

La presente invención también proporciona métodos para detectar y/o diferenciar entre uno o más analitos en una muestra que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto la muestra con un conjunto de perlas específicas para los analitos de interés;

(b) incubar dicho conjunto de perlas con dicha muestra durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir que dicho(s) analito(s) en dicha muestra reacciones específicamente con un reactivo sobre una perla dentro de dicho conjunto de perlas; y

(c) detectar y/o diferenciar analitos en la muestra que se unen a un reactivo sobre dicha perla.

Como se usa en el presente documento, el término "analito patogénico" se refiere a un microorganismo o virus que putativamente infecta, coloniza o ha contaminado de otro modo la muestra. Los analitos de patógenos ejemplares incluyen virus, bacterias, hongos y microorganismos eucariotas. En una realización preferida, "analito" incluye un microorganismo o virus que infecta un organismo multicelular tal como un animal o una planta. En consecuencia, en algunas realizaciones, los analitos patogénicos se pueden considerar como un patógeno de animal o de planta. Sin embargo, la presente invención engloba la detección y diferenciación de analitos no patogénicos que colonizan organismos multicelulares tales como simbioses microbianos de animales (por ejemplo, *Lactobacillus* spp., bacterias de rumiantes), simbioses microbianos de insectos (por ejemplo, *Streptomyces* spp., *Wolbachia* spp.), simbioses microbianos de esponjas (por ejemplo, algas verdes, dinoflagelados, cianobacterias) y similares; endofitos de plantas (por ejemplo, *Mycorrhiza*, *Rhizobium* spp., *Frankia* spp., *Streptomyces* spp.); y similares. Además, el analito puede ser un analito que no esté asociado con un organismo multicelular. Dichos analitos incluyen bacterias, hongos, virus, protistas, nematodos y similares, que colonizan entornos particulares incluidos entornos "naturales" tales como tierra, océanos, agua dulce, hielo, roca, fuentes hidrotermales y aire; entornos sanitarios incluidos hospitales, equipo de hospital, equipo quirúrgico, prendas del personal sanitario y similares; entornos "industriales" incluidas instalaciones de fabricación, instalaciones farmacéuticas, cervecerías, bodegas y similares; entornos de "laboratorio" incluidos fermentadores, cultivos, mesas, equipo y similares.

En consecuencia, las muestras contempladas por la presente invención incluyen muestras industriales tales como aire, agua y tierra, y similares, y muestras biológicas tales como suero, saliva, heces, orina, fluido de tejidos, semen, exudado, pus, fluido respiratorio y moco y frotis de llagas, cánceres y lesiones tópicas. Además, una muestra puede

ser una muestra extraterrestre tal como de un meteorito o de otro planeta. En lo que respecta a esto último, el ensayo de la presente invención se puede adaptar para su uso en un vehículo remoto interplanetario para pruebas de muestras de tierra o polvo o hielo o para probar material de núcleo en un planeta.

En algunas realizaciones preferidas, el analito comprende una bacteria, hongo, virus y/o parásito eucariota que infecta un sujeto animal. Los "sujetos animales" contemplados en el presente documento incluyen cualquier animal, preferentemente un mamífero y más preferentemente un primate incluido un primate inferior y aún más preferentemente, un humano. Por conveniencia, un "animal" también incluye específicamente especies de ganado tales como reses, caballos, ovejas, cerdos, cabras y asnos así como animales de laboratorio incluidos ratones, ratas, conejos, cobayas y hámsteres.

Los analitos humanos que se pueden detectar usando los reactivos y métodos de la presente invención incluyen virus como el virus del papiloma humano (VPH). También se divulga que otros analitos humanos que se pueden detectar usando los reactivos y métodos divulgados en el presente documento incluyen virus tales como coronavirus incluidos el virus SARS, virus de la gripe, virus de la gripe aviar, VIH incluidos VIH-1, VIH-II o HLTIV-IV, Lentivirus en general, virus de hepatitis y similares, los agentes patógenos de enfermedades transmitidas sexualmente tales como clamidia, gonorrea, *Mycoplasma* spp. y sífilis; patógenos transmitidos por la comida tales como *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *E. coli* (en particular, *E. coli* HO 567), *Shigella* spp., *Brucella* spp., *Staphylococcus aureus*; patógenos nosocomiales tales como *S. aureus* incluido *S. Aureus* resistente a meticilina (MRSA) y enterococcus incluido Enterococcus resistentes a vancomicina (VRE); patógenos adquiridos ambientalmente tales como *Legionella* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *Bacillus anthracis* (antrax) y similares.

La muestra en la que se detecta el analito es preferentemente una muestra derivada de un sujeto multicelular que está putativamente infectado o colonizado por el analito. Por lo tanto, la muestra es preferentemente una "muestra biológica". Las muestras biológicas ejemplares que de ningún modo limitan la presente invención incluyen muestras de tejido o células tales como raspados celulares, biopsias y similares y muestras de fluidos corporales incluidos sangre, orina, linfa, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo y similares.

En determinados otros aspectos, los métodos divulgados en el presente documento también son aplicables a la detección de un "analito" en una muestra que no se deriva exclusivamente de un organismo eucariota multicelular. Como tal, lo divulgado en el presente documento se extiende a detectar, y/o diferenciar entre, uno o más taxones o cepas de analitos particulares en muestras tales como muestras ambientales (incluidas muestras de aire, agua y tierra), muestras industriales, muestras de laboratorio y similares. Por ejemplo, los métodos divulgados en el presente documento se pueden usar para evaluar la microflora procariota, la microflora eucariota y o la carga vírica de una muestra de tierra, agua o aire o una muestra derivada de un objeto o superficie artificial.

El analito que se va a detectar es el VPH o una cepa del mismo y la muestra es preferentemente una muestra biológica derivada de un sujeto humano. En otra realización preferida, la muestra biológica comprende una o más células del sujeto, sangre u orina. Lo más preferentemente, la muestra biológica comprende células cervicales recogidas del sujeto. El VPH se describe en detalle por Gearhart *et al.* (www.emedicine.com/MED/topic1037.htm, 2004), que se reproduce en parte a continuación. Los VPH producen tumores epiteliales de la piel y membranas mucosales. Se han detectado sobre 100 tipos de VPH, y se han secuenciado completamente los genomas de casi 70. El sistema de clasificación actual, que se basa en las similitudes en sus secuencias genómicas, en general, se correlaciona con las 3 categorías usadas para describir el VPH clínicamente: anogenital y/o mucosa, cutánea no genital, y epidermodisplasia verruciforme (EV). Están disponibles en internet una base de datos de secuencias genómicas del VPH y un árbol filogénico en "VPH Sequence Database".

Las infecciones por VPH de mucosa se clasifican además como latentes (asintomáticas), subclínicas o clínicas. Las lesiones clínicas son manifiestamente evidentes, mientras que las infecciones latentes sólo se detectan por pruebas de ADN vírico. Las lesiones subclínicas se identifican por la aplicación de ácido acético al 5 % y la inspección bajo aumento. La mayoría de las infecciones por VPH son latentes; las infecciones clínicamente evidentes normalmente dan como resultado verrugas en lugar de neoplasias malignas.

Típicamente, los tipos 6 y 11 del VPH se marcan como de bajo riesgo porque la infección con estos tipos tiene un potencial oncogénico bajo y normalmente da como resultado la formación de condilomas y lesiones precancerosas de bajo grado. Los tipos 16 y 18 del VPH han resultado ser los tipos de alto riesgo del VPH porque son responsables de la mayoría de las lesiones intraepiteliales de alto grado que pueden evolucionar a carcinomas, en particular las de la categoría anogenital y/o mucosa.

La infección por VPH sola no provoca transformación maligna de tejido infectado. En este proceso han estado implicados cofactores tales como el consumo de tabaco, radiación ultravioleta, embarazo, deficiencia de folato, y supresión inmunitaria. La tabla 3 enumera una variedad de enfermedades y los tipos del VPH asociados.

Tabla 3 - Enfermedades y subtipos del VPH asociados

Enfermedad cutánea no genital	Tipo del VPH
Verrugas comunes (verrucae vulgaris)	1, 2, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65
Verrugas plantares (myrmecias)	1, 2, 4, 63
Verrugas planas (verrucae plana)	3, 10, 27, 28, 38, 41, 49
Verrugas de Butcher (verrugas comunes de gente que manipula carne, carne de ave y pescado)	1, 2, 3, 4, 7, 10, 28
Verrugas mosaico	2, 27, 57
Carcinoma de células escamosas ungueal;	16
Epidermodisplasia verruciforme (benigna)	2, 3, 10, 12, 15, 19, 36, 46, 47, 50
Epidermodisplasia verruciforme (maligna o benigna)	5, 8, 9, 10, 14, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 37, 38
Lesiones cutáneas no verrugosas	37, 38
Enfermedad mucosa no genital	Tipo del VPH
Papilomatosis no respiratoria	6, 11
Carcinoma de células escamosas del pulmón	6, 11, 16, 18
Papiloma laríngeo	6, 11, 30
Carcinoma laríngeo	16, 18
Papiloma del seno maxilar	57
Carcinoma de células escamosas de los senos	16, 18
Papilomas conjuntivos	6, 11
Carcinoma conjuntivo	16
Hiperplasia epitelial focal oral (enfermedad de Heck)	13, 32
Carcinoma oral	16, 18
Leucoplaquia oral	16, 18
Carcinoma de células escamosas del esófago	16, 18
Enfermedad anogenital	Tipo del VPH
Condilomas acuminados	6, 11, 30, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 54
Papulosis bowenoide	16, 18, 34, 39, 42, 45
Enfermedad de Bowen	16, 18, 31, 34
Condilomas gigantes (tumores de Buschke-Löwenstein)	6, 11
Neoplasia intraepitelial inespecífica	30, 34, 39, 40, 53, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69
Neoplasia intraepitelial de bajo grado	6, 11, 43
Neoplasia intraepitelial intermedia	31, 33, 35, 42, 44, 45, 51, 52
Neoplasia intraepitelial de alto grado	16, 18, 56, 58
Carcinoma de vulva	6, 11, 16, 18
Carcinoma de vagina	16
Carcinoma de cérvix	16, 18, 31
Carcinoma de ano	16, 31, 32, 33
Carcinoma in situ de pene (eritroplasia de Queyrat)	16
Carcinoma de pene	16, 18

Los papilomavirus son especies altamente específicas y no infectan otras especies, incluso bajo condiciones de laboratorio. Los seres humanos son la única reserva conocida para el VPH.

5 Los papilomavirus son virus sin envoltura de simetría icosaédrica con 72 capsómeros que rodean un genoma que contiene ADN circular bicatenario con aproximadamente 8000 pares de bases.

10 Se cree que los papilomavirus tienen dos modos de replicación, es decir, replicación estable del genoma episómico en células basales y replicación incontrolada, o vegetativa, en células más diferenciadas para generar el virus progenitor. Aunque todas las células de una lesión contienen el genoma vírico, la expresión de genes víricos está estrechamente vinculada al estado de diferenciación celular. La mayoría de los genes víricos no se activan hasta que el queratinocito activado deja la capa basal. La producción de partículas de virus se puede producir sólo en queratinocitos altamente diferenciados; por lo tanto, la producción de virus sólo se produce en la superficie epitelial donde las células se desprenden finalmente al entorno.

15 Se cree que las lesiones por VPH surgen de la proliferación de queratinocitos basales infectados. Típicamente, la infección se produce cuando las células basales se exponen al virus infeccioso a través de una barrera epitelial alterada lo que se podría producir durante las relaciones sexuales o después de abrasiones cutáneas menores. Las infecciones por VPH no han demostrado ser citolíticas, más bien las partículas víricas se liberan como resultado de la degeneración de células de descamación. Además, el virus del VPH puede sobrevivir durante varios meses y a 20 bajas temperaturas sin un huésped.

25 La multiplicación del virus, en general, está confinada al núcleo. En consecuencia, normalmente las células infectadas presentan un alto grado de atipia nuclear. La coilocitosis (del griego koilos, que significa vacío) describe una combinación de (halo) claro perinuclear con un núcleo picnótico o encogido (rasinoide) y es un rasgo característico de infección por papilomavirus productiva.

30 El genoma del VPH existe como ADN episómico circular separado del núcleo de la célula huésped en lesiones por VPH benignas o de bajo riesgo, tales como las típicamente asociadas con los tipos 6 y 11 del VPH. Típicamente, los genomas de los tipos 16 y 18 del VPH de alto riesgo están integrados en el ADN de la célula huésped en lesiones malignas. La presente invención, sin embargo, se extiende a cualquier cepa de VPH incluidas pero sin limitación a las cepas 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. La integración del genoma vírico en el genoma de la célula huésped se considera un distintivo de transformación maligna. Las proteínas E6 y E7 del VPH de los serotipos de alto riesgo han mostrado que inactivan las proteínas supresoras de tumor del huésped p53 y Rb, dando como resultado de este modo una proliferación de células huésped no reguladas y una transformación maligna.

35 Por lo tanto, en otros aspectos, la presente invención proporciona métodos para detectar, y/o diferenciar entre, una o más cepas de VPH particulares en una muestra biológica, comprendiendo dichos métodos las etapas de:

40 (i) aislar el ácido nucleico de una muestra se había obtenido a partir de un sujeto humano, que comprende putativamente VPH,

(ii) amplificar el ácido nucleico de dicha muestra usando cebadores que generan un amplicón que es distinto para dicho analito o una cepa particular de dicho analito,

45 (iii) amplificar opcionalmente una secuencia de ácido nucleico de control,

(iv) efectuar el marcado del/de los amplicón/amplicones enumerados en las etapas (ii) y/o (iii),

50 (v) hibridar el/los amplicón/amplicones marcados a un conjunto de perlas recubierto con reactivos en los que cada miembro del conjunto de perlas comprende una molécula de ácido nucleico que tiene complementariedad con una secuencia de nucleótidos de una cepa de VPH particular o una secuencia de nucleótidos de control, unida o asociada de otro modo con una perla que se puede distinguir fisicoquímicamente, y

55 (vi) determinar a qué reactivo se ha unido un amplicón;

en los que la asociación de un amplicón con un reactivo particular es indicativa de la presencia de una cepa de VPH particular en la muestra.

60 Aún en otros aspectos, la hibridación se produce en presencia de al menos una secuencia de oligonucleótidos señal.

Todavía en otros aspectos, la hibridación se produce en presencia de al menos una secuencia de oligonucleótidos bloqueante.

65 La presente invención permite la detección de ADN de VPH amplificado o, con el uso de una transcriptasa inversa, el ARN correspondiente. Por tanto, la presente invención contempla perlas con ARN o ADN o análogos químicos de los mismos.

Los métodos in vitro de la presente invención se basan, en parte, en detectar y/o diferenciar entre una o más cepas particulares de un analito objeto en una muestra. La referencia en el presente documento a "cepas particulares de un analito objeto" incluye cualquier variante de las especies o taxón del analito. Los ejemplos de "cepas" de un analito incluyen subespecies del analito, variantes del analito con niveles de virulencia diferentes, variantes del analito lo que indica pronósticos diferentes cuando se infecta o se coloniza un huésped, variantes bioquímicas del analito y similares.

En algunas realizaciones preferidas, se pueden adaptar los métodos de la presente invención para detectar y/o diferenciar entre cepas de VPH particulares que están asociadas con un riesgo mayor o un potencial oncogénico mayor en seres humanos (cepas de alto riesgo) y las que están asociadas con un riesgo de carcinoma menor o un potencial oncogénico bajo (cepas de bajo riesgo). En consecuencia, el término cepa de VPH de "alto riesgo" incluye cualquier cepa de VPH que está asociada con el desarrollo de carcinoma, incluido cáncer cervical, en sujetos humanos. Como se indica anteriormente, las cepas de VPH de alto riesgo ejemplares, que de ningún modo limitan la invención, incluyen VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. Las sondas de captura adecuadas sobre las perlas para estas cepas de VPH se muestran en la tabla 2. El término "sonda" y "cebador" se puede usar de forma intercambiable en este contexto. Las cepas de VPH de "bajo riesgo" incluyen las que no están asociadas o sólo débilmente asociadas con un incremento en el riesgo de carcinoma en sujetos humanos. Típicamente, las cepas de VPH de bajo riesgo son las cepas formadoras de verrugas, incluidas VPH 6 y VPH 11.

Las perlas de la presente invención se acoplan a reactivos que interaccionarán específicamente con un analito de interés dado dentro de una muestra. Los reactivos de la presente invención son ácidos nucleicos y los analitos dentro de la muestra que reaccionan específicamente con el reactivo también son ácidos nucleicos.

Por tanto, este aspecto de la invención objeto usa cebadores que se dirigen a regiones conservadas de una cepa de VPH pero que flanquean secuencias genómicas específicas de cepa. Las secuencias específicas de cepa se denominan secuencias "variables" puesto que varían entre cepas en comparación con las secuencias conservadas que son constantes entre cepas. Después de la amplificación, los amplicones se ponen en contacto con subconjuntos de perlas en el conjunto de perlas en el que cada perla de cada subconjunto lleva un cebador o sonda de ácido nucleico de captura que puede hibridarse a los amplicones específicos de cepa. La multiplexación usando el tamaño de perla, la intensidad de fluorescencia y la especificidad de unión a ADN permite la identificación, clasificación y distinción de cepas del VPH.

En consecuencia, otros aspectos de la presente invención contemplan conjuntos de perlas para detectar una o más cepas del VPH y/o para diferenciar entre dos o más cepas del VPH, en los que el conjunto de perlas comprende una pluralidad de familias o subconjuntos de perlas en las que:

(a) las perlas de cada subconjunto son homogéneas con respecto al tamaño;

(b) las perlas dentro de cada subconjunto se acoplan a una sonda de captura de ácido nucleico que se puede unir a una región específica de cepa del VPH de un genoma del VPH u, opcionalmente, una secuencia de ácidos nucleicos de control;

(c) la sonda de captura sobre cada perla se marca con la misma marca con cada subconjunto de perlas que tienen una intensidad fluorescente diferente para crear una mezcla heterogénea de perlas basada en la intensidad fluorescente; y

(d) al menos dos subconjuntos de perlas se mezclan juntas para producir un conjunto de perlas, en el que la identidad del subconjunto y por lo tanto la cepa del VPH se puede identificar por citometría de flujo en base al tamaño, intensidad fluorescente y discriminación de secuencias.

Aún otros aspectos de la presente invención contemplan métodos in vitro para detectar y/o diferenciar entre dos o más cepas del VPH en una muestra, que comprenden las etapas de:

(a) poner en contacto la muestra con un conjunto de perlas que comprenden una pluralidad de familias o subconjuntos de perlas en las que:

(i) las perlas de cada subconjunto son homogéneas con respecto al tamaño,

(ii) las perlas dentro de cada subconjunto se acoplan a una sonda de captura de ácido nucleico que se puede unir a una región específica de cepa del VPH de un genoma del VPH u, opcionalmente, una secuencia de ácidos nucleicos de control,

(iii) la sonda de captura sobre cada perla se marca con la misma marca con cada subconjunto de perlas que tienen una intensidad fluorescente diferente para crear una mezcla heterogénea de perlas basada en la intensidad fluorescente, y

(iv) al menos dos subconjuntos de perlas se mezclan juntas para producir un conjunto de perlas, en el que la identidad del subconjunto y por lo tanto la cepa del VPH se puede identificar por citometría de flujo en base al tamaño, intensidad fluorescente y discriminación de secuencias;

5 (b) incubar dicho conjunto de perlas con dicha muestra durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir que dichos cebadores se unan al genoma del VPH amplificado para generar un replicón que comprende una región específica de cepa;

10 (c) detectar y/o diferenciar los amplicones generados en la muestra que se unen a dichas perlas para, de este modo, identificar o distinguir entre las dos o más cepas de VPH.

Los amplicones para los que las sondas de captura de ácido nucleico son específicos también se pueden marcar con una molécula indicadora fluorescente.

15 Los ácidos nucleicos se pueden aislar a partir de una muestra del sujeto usando cualquier método que sea conveniente con respecto a la naturaleza de la propia muestra y el analito. Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" se refiere a ADN y/o ARN. Típicamente, se aísla ADN, aunque en algunas circunstancias que serán evidentes para un experto en la técnica, puede ser más preferible aislar ARN, por ejemplo, cuando el analito de interés es un virus de ARN. Si se aísla ARN, se puede amplificar el ARN, o se puede transcribir de forma inversa el ARN en ADNc usando métodos estándar, para una amplificación y un análisis posteriores.

20 Preferentemente, el "ácido nucleico" es ADN. Se puede aislar ADN a partir de la muestra usando cualquier medio conveniente. Por ejemplo, en el caso de un virus tal como VPH en una muestra de células humanas, se puede usar guanidina o un agente funcionalmente equivalente para lisar las células. Un método a base de guanidina ejemplar para la lisis celular y la extracción de ADN es el método de Nelson y Krawetz (Anal. Biochem. 207(1):97-201, 1992). Las soluciones de lisis a base de guanidina también están comercialmente disponibles de proveedores tales como Qiagen, por ejemplo, QIAamp, PAXgene, y similares. Sin embargo, los métodos de lisis pueden cambiar dependiendo de la naturaleza de la muestra y del analito. Por ejemplo, para la detección de un analito en una muestra ambiental tal como una muestra de tierra o de sedimento, un sistema de lisis celular a base de perlas de vidrio puede ser más apropiado, tal como el método de Kuske et al. (Appl. Environ. Microbiol. 64(7):2463-2472, 1998). En cualquier caso, el protocolo de lisis apropiado para un analito y muestra dados se podría determinar fácilmente por un experto en la técnica con experimentación no indebida.

25 Después de la lisis de las células, se puede purificar el ADN por cualquier medio convencional, lo que sería fácilmente evidente para un experto en la técnica (véase, por ejemplo, los kits disponibles comercialmente antes en el presente documento). En determinadas realizaciones preferidas de la invención, se purifica el ADN usando una cantidad limitante de un agente de unión a ADN tal como, pero sin limitación, sílice. Por el uso de una cantidad limitante del agente de unión a ADN, se puede aislar una cantidad uniforme de ADN a partir de diferentes muestras ya que la cantidad de ADN recuperado en cada caso es igual a la cantidad máxima de ADN que se puede unir por la cantidad limitante del agente de unión a ADN. A continuación, el ADN unido al agente de unión de ADN se puede recuperar o eluir del agente de unión a ADN usando cualquier medio conveniente.

30 Aunque el ADN es un ácido nucleico preferido, también se puede aislar ARN de la muestra usando cualquier protocolo de aislamiento de ARN estándar. Típicamente, el aislamiento de ARN implica una etapa de ruptura celular y una etapa de aislamiento de ARN. Las técnicas de ruptura celular ejemplares que son adecuadas para el aislamiento de ARN incluyen las presentadas en Ambion Technical Bulletin n.º 183 (www.ambion.com/techlib/tb/tb183.html). Además, una gama de kits de aislamiento de ARN ejemplares que son adecuados para una gama de tipos de muestra se presentan en www.ambion.com/techlib/basics/products/rnaisol_compchart.html. Sin embargo, debe entenderse que la presente invención no se limita de ningún modo por estos métodos y kits específicos para el aislamiento y la purificación de ARN y la presente invención es compatible con cualquier método de aislamiento de ARN que sea evidente para un experto en la técnica.

35 El conjunto de perlas puede comprender, con relación a la detección de VPH tantos subconjuntos de perlas como cepas de VPH. Por tanto, el ensayo puede emplear 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 subconjuntos de perlas cada uno para las cepas del VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. También se pueden usar perlas adicionales para los controles. Las sondas de captura adecuadas se divulgan en la tabla 2.

40 Por lo tanto, otros aspectos de la presente invención se refieren a conjuntos de perlas para detectar una o más cepas de VPH y/o para diferenciar entre dos o más cepas de VPH, en los que el conjunto de perlas comprende una pluralidad de familias o subconjuntos de perlas en los que:

(a) las perlas de cada subconjunto son homogéneas con respecto al tamaño,

45 (b) las perlas dentro de cada subconjunto se acoplan a una sonda de captura de ácido nucleico seleccionada de la lista en la tabla 2 que se puede unir a una región específica de cepa del VPH de un genoma del VPH u, opcionalmente, una secuencia de ácidos nucleicos de control,

(c) la sonda de captura sobre cada perla se marca con la misma marca con cada subconjunto de perlas que tienen una intensidad fluorescente diferente para crear una mezcla heterogénea de perlas basada en la intensidad fluorescente, y

(d) al menos dos subconjuntos de perlas se mezclan juntas para producir un conjunto de perlas;

en los que la identidad del subconjunto y por lo tanto la cepa de VPH se puede identificar por citometría de flujo en base al tamaño, intensidad fluorescente y discriminación de analitos.

Otro aspecto adicional de la presente invención contempla métodos para detectar y/o diferenciar entre dos o más cepas del VPH en una muestra, que comprenden las etapas de:

(a) poner en contacto la muestra con un conjunto de perlas que comprenden una pluralidad de familias o subconjuntos de perlas en las que:

(i) las perlas de cada subconjunto son homogéneas con respecto al tamaño,

(ii) las perlas dentro de cada subconjunto se acoplan a una sonda de captura de ácido nucleico seleccionada de la lista en la tabla 2 que se puede unir a una región específica de cepa del VPH de un genoma del VPH u, opcionalmente, una secuencia de ácidos nucleicos de control,

(iii) la sonda de captura sobre cada perla se marca con la misma marca con cada subconjunto de perlas que tienen una intensidad fluorescente diferente para crear una mezcla heterogénea de perlas basada en la intensidad fluorescente, y

(iv) al menos dos subconjuntos de perlas se mezclan juntas para producir un conjunto de perlas, en el que la identidad del subconjunto y por lo tanto la cepa del VPH se puede identificar por citometría de flujo en base al tamaño, intensidad fluorescente y discriminación de secuencias;

(b) incubar dicho conjunto de perlas con dicha muestra durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir que dichas sondas se unan al genoma del VPH amplificado para generar un replicón que comprende una región específica de cepa; y

(c) detectar y/o diferenciar los amplicones generados en la muestra que se unen a dichas perlas para, de este modo, identificar o distinguir entre las dos o más cepas de VPH.

En consecuencia, los conjuntos de perlas pueden comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 subconjuntos de perlas cada uno con una de una molécula de ácido nucleico seleccionada del listado en la tabla 2. La referencia a estas secuencias específicas de cepa del VPH en la tabla 2 incluye moléculas de ácido nucleico que tienen al menos una identidad del 90 % con estas secuencias o que pueden hibridarse a ellas o a sus formas complementarias bajo condiciones de baja rigurosidad. La referencia a al menos el 90 % incluye 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100 %.

Los métodos de la presente invención se basan, en parte, en amplificar un ácido nucleico a partir de una muestra usando cebadores que se unen a secuencias conservadas entre diferentes cepas del analito del sujeto, pero que generan un amplicón que comprende una secuencia de nucleótidos distinta para cada cepa del analito. En efecto, los cebadores usados en la presente invención se unen a secuencias que se conservan entre cepas del analito del sujeto que flanquea regiones que son al menos parcialmente no conservadas o polimórficas entre cepas. Esquemáticamente, la región amplificada en el analito tiene la estructura general de:

C-X-C'

en la que:

C es una secuencia de nucleótidos que está conservada entre dos o más cepas del analito y es el sitio de unión del cebador "directo";

X es una secuencia de nucleótidos, de la que parte o toda comprende una variación entre diferentes cepas del analito;

C es una secuencia de nucleótidos que está conservada entre dos o más cepas del analito y es el sitio de unión del cebador "inverso".

Es deseable incorporar protuberancias en uno o más de los cebadores para modificar el proceso de amplificación de ácido nucleico; que estén conjugadas al extremo 5' terminal de un cebador. Más preferentemente, una o más protuberancias se conjugan opcionalmente además a un resto 5 Phos o 5AmMC6 en el extremo 5' terminal de la

protuberancia. En determinadas realizaciones preferidas, las protuberancias conjugadas a cebadores directos se seleccionan de: caatcagc, acaat, ggaac, cagctt, attacc, y ctgtt, más preferentemente acaat y ctgtt. En otras realizaciones preferidas, las protuberancias conjugadas a cebadores inversos se seleccionan de: actcactatagg (SEQ ID NO:87) aatacactcactatagg (SEQ ID NO:88) tctaatacgcactcactatagg (SEQ ID NO:89) y aattctaatacgcactcactatagg (SEQ ID NO:90) más preferentemente actcactatagg y tctaatacgcactcactatagg.

En determinadas realizaciones relacionadas con pares de cebadores de amplificación de oligonucleótidos para dirigir el VPH oncogénico, el cebador directo de un par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en:

/5Phos/caatcagc TR TTT GTT ACT GTK GTD GAT ACY A; (SEQ ID NO:33)

/5Phos/acaat CAR YTR TTT GTT ACT GTK GTD GAT A; (SEQ ID NO:34)

/5Phos/acaat CAR YTR TTT GTT ACT GTK GTD GA; (SEQ ID NO:35)

/5Phos/ggaac AAY CAR YTR TTT GTT ACT GTK GT; (SEQ ID NO:37)

/5Phos/cagctt TTT GTT ACT GTK GTD GAT ACY AC HCG; (SEQ ID NO:38)

/5Phos/cagctt TTT GTT ACT GTK GTD GAT ACY AC HCG YAG; (SEQ ID NO:39)

/5Phos/attacc GTK GTD GAT ACY AC HCG YAG TAC; and (SEQ ID NO:40)

/5Phos/ctgtt GTD GAT ACY AC HCG YAG TAC HAA; (SEQ ID NO:41)

y el cebador inverso de un par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en:

/5AmMC6/actcactatagg TGA AAA ATA AAY TGY AAA TCA TAT TCY TCM MCA TG; (SEQ ID NO:42)

/5AmMC6/aatacgcactcactatagg CAY ARY TGA AAA ATA AAY TGY AAA TC (SEQ ID NO:43)

/5AmMC6/tctaatacgcactcactatagg TR CAY ARY TGA AAA ATA AAY TG (SEQ ID NO:44)

/5AmMC6/aattctaatacgcactcactatagg TR CAY ARY TGA AAA ATA AA (SEQ ID NO:45). Como se muestra, un cebador se indica en letras mayúsculas y una protuberancia opcional en cada caso se muestra en letras minúsculas subrayadas. Preferentemente, el cebador directo de un par de cebadores se selecciona de: /5Phos/acaat CAR YTR TTT GTT ACT GTK GTD GA (SEQ ID NO:35) y 75 Phos/ctgtt GTD GAT ACY AC HCG YAG TAC HAA (SEQ ID NO:41). En otras realizaciones preferentes, el cebador inverso de un par de cebadores se selecciona de /5AmMC6/actcactatagg TGA AAA ATA AAY TGY AAA TCA TAT TCY TCM MCA TG (SEQ ID NO:42) and/5AmMC6/tctaatacgcactcactatagg TR CAY ARY TGA AAA ATA AAY TG (SEQ ID NO:41).

En determinados aspectos de la invención, los cebadores incorporan una secuencia de nucleótidos exógena en 5' de región que no se une a cebador conjugada al extremo 5' de una región de cebador de unión a plantilla en 3'. En el presente documento, la secuencia de nucleótidos exógena en 5' se denomina "protuberancia", "abrazadera de protuberancia", "secuencia de protuberancia" o "secuencia de protuberancia exógena", pero no se desea de ningún modo que limite la invención objeto.

Al menos uno de los cebadores directos e inversos está conjugado a una protuberancia en el extremo 5' terminal del cebador. Preferentemente, cuando el cebador directo está conjugado a una protuberancia en el extremo 5' terminal del cebador directo, la protuberancia del cebador directo se selecciona del grupo que consiste en:

CAATCAGC, ACAAT, GGAACAAT, GGAAC, CAGCTT, ATTACC, CTGTT, /5Phos/CAATCAGC, /5Phos/ACAAT, /5Phos/GGAACAAT, /5Phos/GGAAC, /5Phos/CAGCTT, 5Phos/ATTACC, y /5Phos/CTGTT. Preferentemente, cuando el cebador inverso está conjugado a una protuberancia en el extremo 5' terminal del cebador inverso, la protuberancia del cebador inverso se selecciona del grupo que consiste en:

ACTCACTATAGG (SEQ ID NO:87), AATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO:88) TCTAATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO:89) AATTCTAATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO:90) /5AmMC6/ACTCACTATAGG (SEQ ID NO:91), /5AmMC6/AATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO:92), /5AmMC6/TCTAATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO:94), y /5AmMC6/AATTCTAATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO:94), algunas realizaciones más preferidas de pares de cebadores de amplificación de oligonucleótidos que contienen una secuencia de ácido nucleico de protuberancia opcional, el cebador directo del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en:

CAR YTR TTT GTT ACT GTK GTD GA (SEQ ID NO:3), que tiene opcionalmente una ACAAT (SEQ ID NO:110), /5Phos/ACAAT (SEQ ID NO:35), GGAACAAT (SEQ ID NO:111), o una /5Phos/ACAAT (SEQ ID NO:35), GAACAACAAT (SEQ ID NO:36) conjugada con el extremo 5' terminal del cebador; y

GTD GAT ACY AC HCG YAG TAC HAA (SEQ ID NO:8), que tiene opcionalmente una CTGTT (SEQ ID NO:112) o /5Phos/CTGTT (SEQ ID NO:41) conjugada con el extremo 5' terminal del cebador. En algunas realizaciones más preferidas de pares de cebadores de amplificación de oligonucleótidos que contienen una secuencia de ácido nucleico de protuberancia opcional, el cebador inverso del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en:

TGA AAA ATA AAY TGY AAA TCA TAT TCY TCM MCA TG (SEQ ID NO:9), que tiene opcionalmente una ACTCACTATAGG (SEQ ID, 5/AmMC6/ACTCACTATAGG (SEQ ID NO:42) conjugada al extremo 5' terminal del cebador, TR CAY ARY TGA AAA ATA AAY TG (SEQ ID NO:11), que tiene opcionalmente una TCTAATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO:114) o /5AmMC6/TCTAATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO:44) conjugada al extremo 5' terminal del cebador; y TR CAY ARY TGA AAA ATA AAY TG (SEQ ID NO:11), que tienen opcionalmente una TCTAATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO:14) o /5AmMC6/TCTAATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO:44) conjugada al extremo 5' terminal del cebador.

La región del cebador de unión a plantilla en 3' se refiere a un cebador cuya porción 3' se une a una plantilla (por ejemplo, durante la primera etapa de alineamiento para la polimerización de cebadores). El diseño de cebador mencionado anteriormente da como resultado la incorporación de la secuencia de protuberancia en productos de amplificación después del acontecimiento de cebado inicial. Posteriormente, la secuencia de protuberancia en 5' actúa como una abrazadera para igualar la eficacia de la amplificación entre homólogos de amplicones.

La secuencia de protuberancia exógena puede estar sobre el cebador directo o bien el cebador inverso o bien sobre ambos.

Por tanto, la presente invención también contempla métodos para amplificar una molécula diana de ácido nucleico comprendiendo dichos métodos someter una plantilla de ácido nucleico de dicha diana de ácido nucleico a amplificación usando cebadores directos e inversos en los que al menos un cebador contiene una secuencia de nucleótidos exógena en 5' de región que no se une a un cebador conjugada con una región de cebador de unión a plantilla en 3' en los que dicha secuencia de nucleótidos exógena se incorpora en un producto de amplificación después del cebado inicial.

Como se indica anteriormente, el cebador directo o inverso puede comprender la secuencia exógena o ambos pueden llevar la secuencia. Cuando llevan la secuencia exógena, la protuberancia puede ser igual o diferente.

La presente invención se puede aplicar en particular a cebadores que pueden cebar potencialmente un conjunto de homólogos diana de ácido nucleico.

La presente invención contempla además métodos mejorados de amplificación de una molécula de ácido nucleico incluida dentro de una población de moléculas de ácido nucleico relacionadas por amplificación con un cebador directo e inverso, que comprende: seleccionar uno o ambos de los cebadores directos o inversos de modo que uno o ambos contengan una secuencia de nucleótidos exógena en 5' de región que no se une a un cebador conjugada a una región de cebador de unión a plantilla en 3' en los que dicha secuencia de nucleótidos exógena se incorpora en la producción de amplificación después del cebado inicial.

Por tanto, la referencia a una "molécula de ácido nucleico" incluye una familia de moléculas de ácido nucleico relacionadas tales como un grupo de moléculas de ácido nucleico homólogas.

En el presente documento también se divulgan kits para reducir la desviación de la amplificación. También se debe entender que la terminología usada en el presente documento es para el propósito de describir realizaciones particulares.

Los términos y símbolos de química, bioquímica, genética y biología molecular usados en el presente documento cumplen con los tratados y textos estándar en el campo, por ejemplo, Kornberg y Baker, ADN Replication, segunda edición (W.H. Freeman, Nueva York, 1992); Lehninger, Biochemistry, segunda edición (Worth Publishers, Nueva York, 1975); Strachan y Read, Human Molecular Genetics, segunda edición (Wiley-Liss, Nueva York, 1999); Eckstein Ed, Oligonucleótidos y Analogs: A Practical Approach (Oxford University Press, Nueva York, 1991); Gait Ed, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1984); y similares.

"Amplicón" quiere decir el producto de la reacción de amplificación del polinucleótido. Esto es, es una población de polinucleótidos, normalmente pero no necesariamente bicatenarios, que se replican a partir de una o más secuencias de partida. La una o más secuencias de partida pueden ser una o más copias de la misma secuencia, o pueden ser una mezcla de secuencias diferentes. Se pueden producir amplicones por una variedad de reacciones de amplificación cuyos productos son múltiples replicados de uno o más ácidos nucleicos diana. En general, las reacciones de amplificación que producen amplicones son "conducidas por plantilla" porque el apareamiento de bases de los reactivos, nucleótidos o bien oligonucleótidos, tienen complementos en un polinucleótido de plantilla que se requieren para la creación de productos de reacción. En un aspecto, las reacciones conducidas por plantilla

son extensiones de cebadores con una polimerasa de ácido nucleico o ligaduras de oligonucleótidos con una ligasa de ácido nucleico. Dichas reacciones incluyen, pero sin limitación, reacciones de polimerasa lineales PCR, NASBA, amplificaciones por círculo rodante, y similares, divulgadas en las siguientes referencias: Mullis et al, patente de los EE.UU. N.º 4.683.195; 4.965.188; 4.683.202; 4.800.159 (PCR); Gelfand et al, patente de los EE.UU. N.º 5.210.015 (PCR en tiempo real con sondas "Taqman" o "Taq" [marcas registradas]); Wittwer et al, patente de los EE.UU. N.º 6.174.670; Kacian et al, patente de los EE.UU. N.º 5.399.491 ("NASBA"); Lizardi, patente de los EE.UU. 5.854.033; Aono et al, Japanese Patent Publ. N.º JP 4-262799 (amplificación por círculo rodante); y similares.

Una reacción de amplificación puede ser una amplificación en "tiempo real" en la que la química de detección permite que se mida un producto de reacción mientras progresa la reacción de amplificación.

La presente invención se ocupa en particular de reducir la desviación de la amplificación en un intervalo de moléculas de ácido nucleico relacionadas u homólogas. Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico homólogas incluyen homólogos víricos, polimorfismos, células cancerosas relacionadas, homólogos bacterianos, homólogos de células madre entre muchos otros. Un aspecto de la presente invención es la selección de cebadores en puntos potenciales de diferencia entre los homólogos. Los cebadores están pensados para llevar una secuencia de nucleótidos exógena en 5' de región que no se une a cebador conjugada a una región de cebador de unión a plantilla en 3' que se incorpora en un producto de amplificación después de cebado inicial.

La protuberancia o secuencia exógena en 5' puede ser de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 400 bases de longitud y todas las combinaciones y subcombinaciones de las mismas. Preferentemente, la protuberancia es de desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 100, más preferentemente desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 80 bases de longitud, aún más preferentemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 40, todavía más preferentemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 25, siendo incluso más preferido desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 20.

En efecto, la secuencia exógena en 5' tiene opcionalmente un nivel de complementariedad con la secuencia diana, y no contribuye sustancialmente a las etapas de unión a cebador iniciales. Es deseable que la protuberancia tenga una complementariedad menor del 95 % con el cebador de núcleo. Los ejemplos adicionales de los niveles de complementariedad pueden incluir menos del 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 % y 60 %. La complementariedad se determina usando algoritmos estándar.

Como se usa en el presente documento, el término "amplificar" quiere decir realizar una reacción de amplificación. Una "mezcla de reacción" o "recipiente de reacción" quiere decir una solución o compartimento que contiene todos los reactivos necesarios para realizar una reacción, que puede incluir, pero sin limitación, agentes de tamponación para mantener el pH en un nivel seleccionado durante una reacción, sales, cofactores, neutralizadores y similares.

"Complementario o sustancialmente complementario" se refiere a la hibridación o al apareamiento de bases o a la formación de un dúplex entre nucleótidos o ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, entre las dos hebras de una molécula de ADNds o entre un cebador de oligonucleótido y un sitio de unión a cebador o sobre un ácido nucleico monocatenario. Los nucleótidos complementarios son, en general, A y T (o A y U), o C y G. Se dice que dos moléculas de ADN o ARN monocatenarias son sustancialmente complementarias cuando los nucleótidos de una hebra, alineada y compara óptimamente y con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas, se aparea con al menos aproximadamente el 80 % de los nucleótidos de la otra hebra, normalmente al menos aproximadamente del 90 % al 95 %, y más preferentemente desde aproximadamente 98 al 100 %. De forma alternativa, existe complementariedad sustancial cuando, por ejemplo, una hebra de ADN se hibrida bajo condiciones de hibridación con su complemento. Típicamente, se produce hibridación selectiva cuando hay al menos una complementariedad de aproximadamente el 65 % sobre un tramo de al menos 14 a 25 nucleótidos, preferentemente una complementariedad de al menos aproximadamente el 75 %, más preferentemente de al menos aproximadamente el 90 %. Véase, Kanehisa Nucleic Acids Res. 12:203, 1984.

"Dúplex" quiere decir al menos dos oligonucleótidos y/o polinucleótidos que son completa o parcialmente complementarios sufre un apareamiento de bases de tipo Watson-Crick entre todos o la mayoría de sus nucleótidos de modo que se forma un complejo estable. Los términos "alineamiento" e "hibridación" se usan de forma intercambiable para querer decir la formación de un dúplex estable. "Perfectamente emparejados" en referencia a un dúplex quiere decir que las hebras de poli- u oligonucleótidos que forman el dúplex forman una estructura bicatenaria entre sí de modo que cada nucleótido en cada hebra sufre un apareamiento de bases de tipo Watson-Crick con un nucleótido en la otra hebra.

"Locus genético" o "locus" en referencia a un genoma o polinucleótido diana, quiere decir una subregión o segmento contiguo del genoma o polinucleótido diana. Como se usa en el presente documento, locus genético o locus, puede referirse a la posición de un gen o porción de un gen en un genoma, o puede referirse a cualquier porción contigua de la secuencia genómica esté o no dentro, o asociada con, un gen. Preferentemente, un locus genético se refiere a cualquier porción de secuencia genómica de unas pocas decenas de nucleótidos, por ejemplo, 10-30, o 10-100, de longitud, a unos pocos cientos de nucleótidos, por ejemplo, 100-1000 o 100- 500 de longitud, a unos pocos miles de

nucleótidos de longitud, por ejemplo, 1000-10.000 o 1000-3000 de longitud. En algunos contextos, los locus genéticos pueden referirse a la localización de un nucleótido dentro de un genoma.

"Kit" se refiere a cualquier sistema de suministro para suministrar materiales o reactivos para llevar a cabo un método de la presente invención. En el contexto de los ensayos de reacción, dichos sistemas de suministro incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, transporte, o suministro de reactivos de reacción (por ejemplo, sondas, enzimas, etc., en los recipientes apropiados) y/o materiales de soporte (por ejemplo, tampones, instrucciones escritas para realizar el ensayo, etc.) de una localización a otra. Por ejemplo, los kits incluyen uno o más recintos (por ejemplo, cajas) que contienen los reactivos de reacción y/o materiales de soporte relevantes. Dichos contenidos se pueden suministrar al receptor destinado juntos o por separado. Por ejemplo, un primer recipiente puede contener una enzima para su uso en un ensayo, mientras que un segundo recipiente contiene sondas. Los kits también pueden contener compartimentos adaptados para contener los reactivos. En un ejemplo, un compartimento comprende una matriz sólida que tiene oligonucleótidos o cebadores o polinucleótidos inmovilizados en ella que participan en la reacción de amplificación. Un ejemplo de una matriz sólida es una micromatriz. Por lo tanto, un kit puede ser parte de un sistema de amplificación global que tiene un componente reactivo, un componente de ácido nucleico, un componente de hardware y un componente de instrucciones.

"Micromatriz" se refiere a un soporte de fase sólida que tiene una superficie plana, que lleva una matriz de ácidos nucleicos, comprendiendo cada miembro de la matriz copias idénticas de un oligonucleótido o polinucleótido inmovilizado en una región o sitio espacialmente definido, que no se superpone con el de otros miembros de la matriz; esto es, las regiones o sitios son espacialmente discretos. Los sitios de hibridación espacialmente definidos pueden ser adicionalmente "direccionables" porque su localización y la identidad de su oligonucleótido inmovilizado son conocidas o están predeterminadas, por ejemplo, antes de su uso. Típicamente, los oligonucleótidos o polinucleótidos son monocatenarios y están unidos de forma covalente al soporte de fase sólida, normalmente por un extremo 5' o un extremo 3'. La densidad de regiones que no se superponen que contienen ácidos nucleicos en una micromatriz es típicamente mayor de 100 por cm^2 , y más preferentemente, mayor de 1000 por cm^2 . La tecnología de micromatrices se divulga en la siguientes referencias: Schena, Ed, Microarrays: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 2000); Southern, Current Opin. Chem. Biol., 2:404-410, 1998.

Una "micromatriz aleatoria" se refiere a una micromatriz cuyas regiones espacialmente discretas de oligonucleótidos o polinucleótidos no están espacialmente dirigidas. Esto es, la identidad de los oligonucleótidos o polinucleótidos unidos no es apreciable, al menos inicialmente, de esta localización. En un aspecto, las micromatrices aleatorias son matrices planas de microperlas en las que cada microperla tiene unida un único tipo de complemento de etiqueta de hibridación, tal como de un conjunto de oligonucleótidos de hibridación mínimamente cruzada. Asimismo, después de la formación, las microperlas, u oligonucleótidos de las mismas, en una matriz aleatoria se pueden identificar de varias formas, incluidas marcas ópticas, por ejemplo, proporciones de colorantes fluorescentes o puntos cuánticos, forma, análisis de secuencias, o similares.

"Nucleósidos" como se usa en el presente documento incluye los nucleósidos naturales, incluidas las formas 2'-desoxi y T-hidroxi, por ejemplo, como se describe en Komberg y Baker, DNA Replication, 2ª ed. (Freeman, San Francisco, 1992).

"Reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR", quiere decir una reacción para la amplificación *in vitro* de secuencias de ADN específicas por la extensión de cebadores simultánea de hebras complementarias de ADN. En otras palabras, PCR es una reacción para preparar múltiples copias o replicados de un ácido nucleico diana flanqueado por sitios de unión a cebador, comprendiendo dicha reacción una o más repeticiones de las siguientes etapas: (i) desnaturalizar el ácido nucleico diana, (ii) alinear cebadores con los sitios de unión a cebador, y (iii) extender los cebadores por una polimerasa de ácido nucleico en presencia de trifosfatos de nucleósidos. Normalmente, la reacción se cicla por medio de diferentes temperaturas optimizadas para cada etapa en un instrumento ciclador térmico. Las temperaturas, duraciones en cada etapa y tasas de cambio entre etapas particulares dependen de muchos factores bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, ejemplificados por las referencias: McPherson et al, (Eds), PCR: A Practical Approach y PCR2: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1991 y 1995, respectivamente). Por ejemplo, en una PCR convencional usando Taq ADN polimerasa, se puede desnaturalizar un ácido nucleico diana bicatenario a una temperatura $>90^\circ\text{C}$, alinear cebadores a una temperatura en un intervalo de $35-90^\circ\text{C}$. El término "PCR" engloba formas derivadas de la reacción, incluidas pero sin limitación, RT-PCR, PCR en tiempo real, PCR con cebadores internos, PCR cuantitativa, PCR multiplexada, PCR en fase sólida potenciada y similares. Para detalles adicionales de PCR en fase sólida potenciada, véase, por ejemplo, Park, et al., Analytical Biochemistry, 375 (2008), p. 391-393. En determinadas realizaciones de la presente invención se prefiere el uso de PCR en fase sólida potenciada para la generación y/o amplificación de moléculas de ácido nucleico relacionadas, por ejemplo, con cepas del VPH. Aún más preferido es el uso de uno o más pares de cebadores directo/inverso destacado en el presente documento en la amplificación por PCR en fase sólida potenciada de moléculas de ácido nucleico relacionadas con cepas del VPH.

Usando el formato ESP-PCR, los fosfatos en 5-prima son opcionales puesto que el amplicón monocatenario no se requiere como producto de PCR final. Los grupos funcionales amina en 5-prima también son funcionales en este formato y se pueden usar como medios preferidos de marcado con un fluoróforo para la generación de señal. Sin

embargo, también se pueden emplear muchos medios alternativos de generación de señal en los que no hay ningún requisito para cualquier grupo funcional o para un grupo funcional alternativo. Por ejemplo, los cebadores de PCR pueden no estar marcados con flúor, y se pueden emplear 'oligonucleótidos señal' separados que están conjugados con una señal. En otro ejemplo, usando el formato ESP-PCR, se pueden usar todos los cebadores de PCR 'acuosos' sin grupos funcionales y la señal se podría introducir de forma alternativa por medio de la incorporación de un análogo de nucleótido marcado. En otras realizaciones, usando el formato ESP-PCR, se pueden usar todos los cebadores de PCR 'acuoso' sin grupos funcionales, y se podría introducir la señal por medio de un cebador de soporte sólido marcado de modo que se incremente la señal en el contexto de producto bicatenario.

Los medios alternativos para la generación de amplicón monocatenario incluyen la conversión de ADN bicatenario en ADN monocatenario separando las hebras o retirando una hebra del dúplex. Las hebras del dúplex se pueden separar por medios térmicos o químicos de ruptura de enlaces entre hebras. La retirada de una hebra permite la recuperación de la hebra deseada y la eliminación de su complemento, por ejemplo, Nikiforov et al. (patente de los EE.UU. N.º 5.518.900), que describieron la modificación de uno de los dos cebadores usados para la amplificación por incorporación de derivados de nucleótidos fosforotiatos en el extremo 5' del cebador modificado, haciéndolo resistente a la digestión por exonucleasa. Después de amplificar secuencias diana usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el ADNds se somete a digestión por exonucleasa. La hebra no protegida se digiere preferencialmente por una exonucleasa de 5' a 3', dejando un producto monocatenario que consiste en la otra hebra. Estrategias similares han usado cebadores ramificados resistentes a exonucleasa (Shchepinov et al., Nuc. Acids. Res. 25:4447-4454 1997) o preferencia por sustrato que lleva fosfato en 5' de Lambda exonucleasa (Higuchi et al., Nucl. Acids Res. 25:5685, 1989)

La PCR asimétrica (Gyllensten y Erlich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7652-7656 1988; patente de los EE.UU. N.º 5.066.584) genera ADNss durante el termociclado empleando una concentración de par de cebadores desequilibrada de modo que el cebador esté a una concentración limitante. Esto favorece el producto de ADNss cebado por el cebador en exceso.

La PCR asimétrica de cebador competidor (Gillespie, 1997; solicitud de patente de los EE.UU. N.º 08/628.417) emplea la adición separada del cebador competidor después del termociclado de PCR y antes de termociclar adicionalmente para generar ADNss. Kaltenboeck et al., Biotechniques 12:164-171, 1992 describieron un método de producción de ADNss realizando inicialmente una PCR para generar ADNds, seguido de una reacción separada usando el producto de la primera PCR como plantilla para una segunda amplificación lineal empleando un cebador. Véase, también, la patente de los EE.UU. 6.887.664 para ejemplos de PCR asincrónica.

Los volúmenes de reacción varían desde unos pocos cientos de nanolitros, por ejemplo, 200 nl, hasta unos pocos cientos de µl, por ejemplo, 200 µl. "PCR de transcripción inversa," o "RT-PCR," quiere decir una PCR que está precedida por una reacción de transcripción inversa que convierte un ARN diana en un ADN monocatenario complementario, que a continuación se amplifica, por ejemplo, Tecott et al, patente de los EE.UU. N.º 5.168.038, patente que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. "PCR en tiempo real" quiere decir una PCR para la que se monitoriza la cantidad de producto de reacción, es decir el amplicón, mientras procede la reacción. Hay muchas formas de PCR en tiempo real que difieren principalmente en la química de detección usada para monitorizar el producto de reacción, por ejemplo, Gelfand et al, patente de los EE.UU. N.º 5.210.015 ("taqman"); Wittwer et al, patente de los EE.UU. N.º 6.174.670 y 6.569.627 (colorantes intercalantes); Tyagi et al, patente de los EE.UU. N.º 5.925.517 (balizas moleculares).

La química de detección para PCR en tiempo real se revisan en Mackay et al, Nucleic Acids Research, 30: 1292-1305, 2002. "PCR con cebadores internos" quiere decir una PCR en dos fases en la que el amplicón de una primera PCR se vuelve la muestra para una segunda PCR usando un nuevo conjunto de cebadores, de los que al menos uno se une a una localización interior del primer amplicón.

Se propone que los acontecimientos de cebado iniciales se realicen con cebadores directos e inversos en los que uno o ambos lleven una secuencia de nucleótidos exógena en 5' de región que no se une a cebador conjugada con una región de cebador de unión a plantilla en 3' en los que la secuencia de nucleótidos exógena se incorpore en un producto de amplificación después de un cebado inicial.

El uso de una secuencia de protuberancia en 5' de región que no se une a cebador conjugada con una región de cebador de unión a plantilla en 3' como diseño de cebador da como resultado la incorporación de la secuencia de protuberancia en productos de amplificación después del acontecimiento de unión a cebador inicial. Posteriormente, la secuencia de protuberancia en 5' actúa como una abrazadera para igualar la eficacia de la amplificación entre homólogos. Como tal, la desviación de la amplificación se restringe a acontecimientos de unión a cebador iniciales. La "abrazadera de protuberancia" se puede situar en cualquiera o en ambos de los cebadores directos e inversos dependiendo del requisito. Existe una gran libertad de diseño en lo que respecta a de qué secuencia se compone la secuencia de "abrazadera de protuberancia" para adaptar a la aplicación particular. La secuencia de cebador de unión a plantilla en 3' podría tomar la forma de secuencia degenerada, secuencia consenso o un híbrido de secuencias consenso y degenerada. También se puede emplear un grupo de secuencias de emparejamiento exacto. En todos estos casos, se puede emplear el principio de "abrazadera de protuberancia".

"Polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan de forma intercambiable y cada uno quiere decir un polímero lineal de monómeros nucleotídicos. Los monómeros compuestos de polinucleótidos y oligonucleótidos se pueden unir específicamente a un polinucleótido natural por medio de un patrón regular de interacciones monómero-a-monómero, tales como apareamiento de bases de tipo Watson-Crick, apilamiento de bases, apareamiento de bases de los tipos Hoogsteen o Hoogsteen inversa, o similares.

Siempre que un polinucleótido o oligonucleótido esté representado por una secuencia de letras (mayúsculas o minúsculas), tal como "ATGCCTG," se entenderá que los nucleótidos están en el orden 5' -> 3' de izquierda a derecha y que "A" denota desoxiadenosina, "C" denota desoxicitidina, "G" denota desoxiguanosina y "T" denota timidina, "I" denota desoxiinosina, "U" denota uridina, a menos que se indique de otro modo o sea obvio en el contexto.

"Cebador" quiere decir un oligonucleótido, natural o bien sintético que puede actuar, después de formar un dúplex con una plantilla de polinucleótido, como un punto de iniciación de la síntesis de ácido nucleico y extenderse desde su extremo 3' a lo largo de la plantilla de modo que se forma un dúplex extendido.

Normalmente, la extensión de un cebador se lleva a cabo con una polimerasa de ácido nucleico, tal como una ADN o ARN polimerasa. La secuencia de nucleótidos añadida en el proceso de extensión se determina por la secuencia del polinucleótido de plantilla. Normalmente, los cebadores se extienden por una ADN polimerasa. Normalmente, los cebadores tienen una longitud en el intervalo de desde 14 hasta 40 nucleótidos, o en el intervalo de desde 18 hasta 36 nucleótidos. Se emplean cebadores en varias reacciones de amplificación nucleicas, por ejemplo, reacciones de amplificación lineal usando un único cebador, o PCR, empleando dos o más cebadores. La orientación para seleccionar las longitudes y secuencias de cebadores para aplicaciones particulares es bien conocida por los expertos en la técnica, como se evidencia en las siguientes referencias: Dieffenbach (Ed), PCR Primer: A Laboratory Manual, 2ª edición (Cold Spring Harbor Press, Nueva York, 2003).

"Muestra" quiere decir una cantidad de material de una fuente biológica, ambiental médica o de paciente, en la que se busca la detección de medida de ácidos nucleicos diana. Por un lado, se entiende que incluye un espécimen o cultivo (por ejemplo, cultivos microbiológicos). Por otro lado, se entiende que incluye muestras tanto biológicas como ambientales. Una muestra puede incluir un espécimen de origen sintético. Las muestras biológicas pueden ser animales, incluidas humanas, de fluido, sólidas (por ejemplo, heces) o de tejido, así como productos de alimentos y piensos líquidos y sólidos e ingredientes tales como productos lácteos, vegetales, carne y subproductos cárnicos y residuos. Las muestras biológicas pueden incluir materiales tomados de un paciente incluidos, pero sin limitación, cultivos, sangre, saliva, líquido ceforraquídeo, líquido pleural, leche, linfa, esputo, semen, aspirados por aguja y similares. Las muestras biológicas se pueden obtener a partir de todas las diversas familias de animales domésticos, así como animales asilvestrados o salvajes, incluidos, pero sin limitación animales tales como ungulados, osos, peces, roedores, etc.. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como materia de superficie, tierra, agua y muestras industriales, así como muestras obtenidas de instrumentos, aparatos, quipo, utensilios, artículos desechables y no desechables de procesamiento de comida y lácteos. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de los tipos de muestras aplicables a la presente invención.

Por tanto, algunos aspectos de la presente invención proporcionan métodos para amplificar una molécula diana de ácido nucleico, comprendiendo: someter una plantilla monocatenaria de dicha diana de ácido nucleico a amplificación usando cebadores directos e inversos en los que al menos un cebador contiene una secuencia de nucleótidos exógena en 5' de región que no se une a cebador conjugada con una región de cebador de unión a plantilla en 3' en los que dicha secuencia de nucleótidos exógena se incorpora en un producto de amplificación después del cebado inicial.

Otros aspectos de la presente invención contemplan métodos mejorados de amplificación de una molécula de ácido nucleico incluida dentro de una población de moléculas de ácido nucleico relacionadas por amplificación con un cebador directo e inverso, que comprende: seleccionar uno o ambos de los cebadores directos o inversos de modo que uno o ambos contengan una secuencia de nucleótidos exógena en 5' de región que no se une a cebador conjugada a una región de cebador de unión a plantilla en 3' en los que dicha secuencia de nucleótidos exógena se incorpora en la producción de amplificación después del cebado inicial.

Los ejemplos de secuencias de protuberancia incluyen:

Secuencia promotora de T7a 25-mera:

AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG G; (SEQ ID NO: 95)

Cebador de secuenciación de M13/pUC (-40)

GTT TTC CCA GTC ACG AC; (SEQ ID NO:96)

Cebador de secuenciación de M13/pUC (-20), 17-mero

GTA AAA CGA CGG CCA GT; (SEQ ID NO:97)

5 Cebador de secuenciación inversa de M13/pUC (-26), 17-mero

CAG GAA ACA GCT ATG AC; (SEQ ID NO: 98)

Cebador de secuenciación de M13/pUC (-40), 17-mero

10 GTT TTC CCA GTC ACG AC; (SEQ ID NO:96)

Cebador de secuenciación de M13/pUC (-46), 22-mero

15 GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A; (SEQ ID NO: 99)

Cebador de secuenciación inversa de M13/pUC (-46), 24-mero

20 GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG; (SEQ ID NO: 100)

Cebador de secuenciación promotora de SP6, 18-mera

ATT TAG GTG ACA CTA TAG; (SEQ ID NO:101)

25 Cebador de secuenciación promotora de SP6, 24-mera

CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG; (SEQ ID NO:102)

Cebador de secuenciación promotora de T7, 20-mera

30 TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG; (SEQ ID 103)

Cebador de secuenciación promotora de T7, 17-mera

35 ATT AAC CCT CAC TAA AG; y, (SEQ ID NO:104)

Cebador de secuenciación promotora de T7, 24-mera

40 GCG CGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG. (SEC ID N.º: 105)

La amplificación de sitios ce cebador tales como los descritos anteriormente de forma eficaz el uso de un conjunto de cebadores "universal", que se une a C y C' para amplificar X desde un intervalo de cepas del analito. Además, se debe señalar que el amplicón amplificado usando los cebadores universales puede comprender regiones tanto conservadas como variables.

Se usan cebadores que amplifican secuencias del VPH. Más preferentemente, estos cebadores son GPS+ es 5' TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC 3' (SEQ ID NO:13) y GP67 es 5' GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C 3 (SEQ ID NO:14). Estos cebadores generan un amplicón del VPH que comprende tanto una región conservada (definida como Y en la figura 2), como una región que es variable entre diferentes cepas de VPH (definida como X en la figura 2).

En otras realizaciones, estos cebadores son GP5d2+ es 5' TTT KTT ACH GTK GTD GAT ACH AC 3' (SEQ ID NO:21) y T7 aGP6d+ es 5' AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA AAH ATA AAY TGY AAD TCA TAY TC 3' (SEQ ID NO:22).

En otra realización, estos cebadores son GP5d33 es 5' 5Phos TTT GTT ACH GTD GTD GAY ACH AC 3' (SEQ ID NO:23) y T7aCP6d+μ es 5'/5AmMC6/AATTCT ACT ACG ACT CAC TAT AGG GGA AAH ATA AAY TGY ARD TCA WAY TC 3' (SEQ ID NO:28)

Los cebadores directos de un par de cebadores se seleccionan del grupo que consiste en:

TR TTT GTT ACT GTK GTD GAT ACY A (SEQ ID NO:1), que tiene opcionalmente una caatcagc (SEQ ID NO:115) o

CAR YTR TTT GTT ACT GTK GTD GAT A (SEQ ID NO:2) que tiene opcionalmente una acaat (SEQ ID NO:34) o /5Phos/aca (SEQ ID NO:34) conjugada con el extremo 5' terminal del cebador;

CAR YTR TTT GTT ACT GTK GTD GA (SEQ ID NO:3), que tiene opcionalmente una acaat (SEQ ID NO:110) o /5Phos/acaat (SEQ ID NO:35) conjugada con el extremo 5' terminal del cebador;

5 AAY CAR YTR TTT GTT ACT GTK GT (SEQ ID NO:4), que tiene opcionalmente una ggaac (SEQ ID NO:117) o /5Phos/ggaac (SEQ ID NO:37) conjugada con el extremo 5' terminal del cebador

TTT GTT ACT GTK GTD GAT ACY AC HCG (SEQ ID NO:5), que tiene opcionalmente una cagctt (SEQ ID NO:118) o

10 TTT GTT ACT GTK GTD GAT ACY AC HCG YAG (SEQ ID NO:6), que tiene opcionalmente una cagctt (SEQ ID NO:119) /5Phos/cagctt (SEQ ID NO:39) conjugada con el extremo 5' terminal del cebador;

GTK GTD GAT ACY AC HCG YAG TAC (SEQ ID NO:7), que tiene opcionalmente una /5Phos/attacc (SEQ ID NO:70) conjugada con el extremo 5' terminal del cebador; y

15 GTD GAT ACY AC HCG YAG TAC HAA (SEQ ID NO:8), que tiene opcionalmente una attacc (SEQ ID NO:120) o /5Phos/ctgtt (SEQ ID NO:41) conjugada con el extremo 5' terminal del cebador; y

los cebadores inversos de un par de cebadores se seleccionan del grupo que consiste en:

20 TGA AAA ATA AAY TGY AAA TCA TAT TCY TCM MCA TG (SEQ ID NO:9), que tiene opcionalmente una actcactatagg (SEQ ID NO:113) o /5AmMC6/actcactatagg (SEQ ID NO:42) conjugada con el extremo 5' terminal del cebador;

25 CAY ARY TGA AAA ATA AAY TGY AAA TC (SEQ ID NO:10), que tiene opcionalmente una aatacgcactcactatagg o (SEQ ID NO:123) /5AmMC6/aatacgcactcactatagg (SEQ ID NO:43) conjugada con el extremo 5' terminal del cebador;

TR CAY ARY TGA AAA ATA AAY TG (SEQ ID NO:11), que tiene opcionalmente una tctaatacgcactcactatagg (SEQ ID NO:114) o /5 AmMC6/tctaatacgcactcactatagg (SEQ ID NO:144) conjugada con el extremo 5' terminal del cebador; y

30 TR CAY ARY TGA AAA ATA AA (SEQ ID NO:122), que tiene opcionalmente una aattctaatacgcactcactatagg (SEQ ID NO:122) o /5 AmMC6/aattctaatacgcactcactatagg (SEQ ID NO:45) conjugada con el extremo 5' terminal del cebador. De forma alternativa, los cebadores directos e inversos se seleccionan de un grupo de cebadores similares a los descritos anteriormente en el presente documento, pero que pueden diferir de los cebadores directos o inversos descritos anteriormente en el presente documento en desde 0 hasta aproximadamente 5 sustituciones de nucleótidos, preferentemente de 0 a aproximadamente 2 sustituciones, en sitios en los que las sustituciones de nucleótidos se producen entre cepas de VPH diferentes, pero con la exclusión de sustituciones de al menos dos nucleótidos en el extremo 3'. La invención también contempla sustituciones similares para secuencias de protuberancia opcionales como las de cebadores directos e inversos descritas anteriormente en el presente documento, dichas protuberancias opcionales conjugadas con el extremo 5' terminal de cualquiera de los cebadores directos o inversos divulgados anteriormente en el presente documento. En determinadas realizaciones preferidas, el cebador directo se selecciona de CAR YTR TTT GTT ACT GTK GTD GA (SEQ ID NO:3), que tiene opcionalmente una acaat (SEQ ID NO:110) o /5Phos/acaat (SEQ ID NO:35) conjugada con el extremo 5' terminal del cebador y GTD GAT ACY AC HCG YAG TAC HAA (SEQ ID NO:8), que tiene opcionalmente una ctgtt (SEQ ID NO:112) o/5Phos/ctgtt (SEQ ID NO:41) conjugada con el extremo 5' terminal del cebador. En determinadas otras realizaciones preferidas, el cebador inverso se selecciona de TGA AAA ATA AAY TGY AAA TCA TAT TCY TCM MCA TG (SEQ ID NO:19), que tiene opcionalmente una actcactatagg (SEQ ID NO:113) o /5AmMC6/actcactatagg (SEQ ID NO:42) conjugada al extremo 5' terminal del cebador y TR CAY ARY TGA AAA ATA AAY TG (SEQ ID NO:11), que tiene opcionalmente una tctaatacgcactcactatagg (SEQ ID NO:114) o /5 AmMC6/tctaatacgcactcactatagg (SEQ ID NO:44) conjugada al extremo 5' terminal del cebador.

Las descripciones anteriores muestran ejemplos de pares de cebadores útiles en la presente invención. Se pueden formar pares de cebadores adicionales apareando cebadores directos (por ejemplo, GP5+, GP5d2+, etc.) e inversos (por ejemplo, GP6+, T7aGP6d+) diferentes entre sí.

55 Determinadas realizaciones de la invención se refieren a fragmentos de cualquiera de los cebadores divulgados en el presente documento incluidas todas las combinaciones y subcombinaciones de dichos fragmentos de cebadores, hasta un límite inferior de fragmentos de núcleo en 3-primera de aproximadamente 20-mero de cualquiera de los cebadores divulgados. Como se usa en el presente documento, un "fragmento" se refiere a una secuencia oligomérica de ácido nucleico de sonda o cebador truncado formada por delección de uno o más nucleótidos del cebador original.

La presente invención también contempla la amplificación de secuencias de control. En una realización, la secuencia de control puede incluir una región del genoma del sujeto del que se deriva una muestra biológica. Sin embargo, la presente invención no se limita de ningún modo a estas secuencias de control particulares y también se contemplan otras secuencias de control que serán evidentes para un experto en la técnica. Además,, los métodos de la presente invención también se pueden realizar sin la amplificación de una secuencia de control.

En algunas realizaciones, la secuencia de control se amplifica a partir del genoma de un sujeto humano usando los cebadores MLC1_F, que comprende la secuencia de nucleótidos 5'TAC ACA CAG GTG TAC ACA GA 3' (SEQ ID NO:106) y MLC1_R que comprende la secuencia 5' ACC AAG TAC TCT ACG TGT TG 3' (SEQ ID NO:107).

En otras realizaciones, la secuencia de control se amplifica a partir del genoma de un sujeto humano usando los cebadores mlc_1_95f que comprende la secuencia de nucleótidos 5' GGC ACC CAG ACA TAC AC 3' (SEQ ID NO:108) y T7 amlc1_275r (HeelMLCR), que comprende la secuencia 5' AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA AAH ATA AAY TGY AAD TCA TAY TC 3' (SEQ ID NO:109).

El ADN aislado se puede amplificar usando cualquier protocolo de amplificación de ADN. Una gama de métodos ejemplares para la amplificación de ADN que de ningún modo limitan la invención se presentan en *"DNA amplification: Current Technologies and Applications"* (Demidov y Broude Ends., Horizon Bioscience, 2004).

El ARN aislado se puede amplificar usando cualquier método de ARN conocido en la técnica y se han desarrollado varias tecnologías de amplificación de ARN. Dos categorías principales des estas son: (i) las que utilizan el ciclado térmico tales como RT-PCR y (ii) ensayos isotérmicos tales como la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) (Compton, Nature 350:91-92, 1991; Kievits et al., J. Virol. Methods 35:273-286, 1991) y la amplificación mediada por transcripción (TMA) (Hill, J. Clin. Ligand Assay 19:43-51, 1996). Los ensayos isotérmicos se pueden subdividir, en base a si: (i) copian y amplifican la secuencia diana, tal como TMA, NASBA y replicación de secuencia autosostenida (3SR) (Guatelli et al., Proc. Natl Acad Sci. USA 87:1874-1878, 1990; Chadwick et al., J. Virol. Methods 70:59-70, 1998; para su revisión véase Chan y Fox, Rev. Med Microbiol. 10:185-196, 1999), o (ii) generan una señal dependiente de diana que se puede amplificar adicionalmente, por ejemplo, ensayos invasores (Lyamichev et al., Nat. Biotechnol. 17:292-296, 1999; Ryan et al., Mol. Diagn. 4:135-144, 1999). Existen varias otras tecnologías de amplificación que no se ajustan fácilmente en estas categorías, tales como Q beta replicasa (Lizardi et al., Biotechnology 6:1197-1202, 1988) y ADN ramificado (Todd et al., J. AIDS Hum. Retrovirol. 10:S35-544, 1995; Pawlowsky et al., J. Virol. Methods 79:227-235, 1999). Sin embargo, se debe entender que la presente invención contempla cualquier método de amplificación de ARN que sea evidente para un experto en la técnica. Además, se debe entender que la presente invención también contempla el uso de transcriptasa inversa o un equivalente funcional de la misma para convertir ARN en ADN que a continuación se pueda amplificar posteriormente.

De acuerdo con la presente invención, se marcan los amplicones enumerados en las etapas (iii) y/o (iv) de los métodos descritos anteriormente. Los amplicones de la presente invención se pueden marcar usando cualquier medio conveniente. Los métodos ejemplares incluyen métodos tanto pre- como post-síntesis. Los métodos de marcado presíntesis incluyen el marcado de un cebador de PCR que se usa posteriormente para amplificación de, y se incorpora de este modo en, un amplicón por medio de PCR. En este método, típicamente la marca se une al extremo 5' de un cebador adecuado para la amplificación del amplicón, aunque también se contempla el marcado en otras posiciones dentro del cebador, tal como el marcado en 3' o el marcado no terminal.

También se puede usar un enlazador químico entre la marca y el polinucleótido que se marca. Las secuencias de enlazadores apropiados se establecerán fácilmente por los expertos en la técnica, y es probable que incluyan enlazadores tales como modificadores amino C₆, C₇ y C₁₂ y enlazadores que comprenden grupos tiol. Como se establecerá fácilmente, un cebador puede comprender el enlazador y la marca, o el enlazador solo, al que se puede unir la marca en una fase posterior.

Los métodos de marcado post-amplificación incluyen sistemas de marcado por mella en los que un polinucleótido marcado se sintetiza a partir del amplicón usando polimerasa Klenow, o un equivalente funcional de la misma, a partir de cebadores aleatorios. Los nucleótidos marcados, o los nucleótidos que comprenden un grupo enlazador, se pueden incorporar en el polinucleótido sintetizado con polimerasa Klenow durante la síntesis.

En cualquier caso, otros métodos de marcado serán fácilmente evidentes para un experto en la técnica y se debe entender que la presente invención no está en modo alguno definida o limitada por la elección del método de marcado.

Preferentemente, la marca usada es un "marcador fluorescente" o "fluoróforo". Muchos marcadores fluorescentes diferentes serán familiares para los expertos en la técnica y la elección del marcador fluorescente de ningún modo limita la invención. En otras realizaciones preferidas de la presente invención, los marcadores fluorescentes de la presente invención comprenden cualquier marcador fluorescente que se pueda unir a un polinucleótido y que se pueda excitar usando una fuente de luz seleccionada del grupo a continuación:

(i) Láseres de iones de argón: comprenden una línea de 488 nm, azul, que es adecuada para la excitación de muchos colorantes y fluorocromos que presentan fluorescencia en la región de verde a roja. También están disponibles láseres de argón sintonizables que emiten en un intervalo de longitudes de onda (458 nm, 488 nm, 496 nm, 515 nm y otras).

(ii) Láseres de diodo: tienen una longitud de onda de emisión de 635 nm. Otros láseres de diodo que ahora están disponibles funcionan a 532 nm. De forma interesante, esta longitud de onda excita óptimamente el yoduro de

propidio (PI). La tinción PI se usa ampliamente para el análisis de ADN, recuento vivo/muerto y determinación de ploidía. También están disponibles láseres de diodo azul que emiten luz aproximadamente a 476 nm.

(iii) Láseres de gas Heme: funcionan con la línea de 633 nm roja.

(iv) Láseres He CD: funcionan a 325 nm.

(v) Lámpara de arco de mercurio de 100 W: la fuente de luz más eficaz para la excitación de colorantes UV tipo Hoechst y DAPI.

En realizaciones más preferidas de la presente invención, los marcadores fluorescentes se seleccionan de: hidroxycumarina, aminocumarina, metoxicumarina, azul Cascade, amarillo Lucifer, NBD, ficoeritrina (PE), PerCP, alofocianina, Hoechst 33342, DAPI, azul SYTOX, Hoechst 33258, cromomicina A3, mitramicina, YOYO-1, verde SYTOX, naranja SYTOX, 7-AAD, naranja de acridina, TOTO-1, To-PRO-1, naranja de tiazol, TOTO-3, TO-PRO-3, LDS 751, colorantes Alexa Fluor incluidos Alexa Fluor-350, -430, -488, -532, -546, -555, -556, -594, -633, -647, -660, -680, -700 y -750; colorantes BoDipy, incluidos BoDipy 630/650 y BoDipy 650/665; colorantes CY, en particular Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 y Cy7; 6-FAM (fluoresceína); PE-Cy5, PE-Cy7, fluoresceína dT; hexaclorofluoresceína (Hex); 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE); colorantes Oregon Green, incluidos 488-X y 514; colorantes rodamina, incluidos X-rodamina, lisamina rodamina B, verde rodamina, rojo rodamina y ROX; TRITC, tetrametilrodamina (TMR); carboxitetrametilrodamina (TAMRA); tetraclorofluoresceína (TET); Rojo 6B, FluorX, BODIPY-FL, colorante SYBR Green I, y rojo Texas. En realizaciones particularmente preferidas de la presente invención, el marcador es Cy5, lo que es particularmente conveniente para la práctica de la presente invención.

Sin embargo, en realizaciones alternativas de la invención, se pueden usar marcas radioactivas o no radioactivas para marcar el amplicón. Las marcas radioactivas convenientes incluyen ^{32}P y ^3H . Estas marcas se pueden incorporar en el amplicón y/o cebador usando cualquier medio conveniente. También se puede usar una gama de métodos de marcado no radioactivos. Los métodos de marcado no radioactivos ejemplares que de ningún modo limitan la presente invención se presentan en Speel (Histochem. Cell Biol. 112:89-113, 1999).

Se debe entender que el término "reactivo" como se usa en el presente documento comprende un polinucleótido inmovilizado en una perla. Más en particular, cada reactivo comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que es complementaria con un amplicón generado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, que está unido o asociado de otro modo con una perla se puede distinguir fisicoquímicamente. Un reactivo también puede comprender una secuencia que sea complementaria con una secuencia de control como se define anteriormente en el presente documento, es decir, una secuencia amplificada a partir de un genoma de un organismo multicelular (Z) o el amplicón de una secuencia de nucleótidos que se conserva entre las cepas del analito (Y).

En consecuencia, un conjunto de perlas de reactivos puede comprender:

$[B_1\text{-cX}_1, B_2\text{-cX}_2, B_3\text{-cX}_3 \dots B_n\text{-cX}_n, B_y\text{-cY}, B_z\text{-cZ}]$

en el que:

$B_1 \dots B_n, B_y, B_z$ son cada uno perlas que se puede distinguir fisicoquímicamente;

cX_n es un polinucleótido inmovilizado en una perla en el que dicho polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico particular que es específica para un analito o una cepa particular de un analito objeto y en el que n es el número de analitos o cepas particulares de un analito objeto que se va a detectar usando el conjunto de perlas;

cY es un miembro opcional del conjunto de perlas y es un polinucleótido inmovilizado en una perla en el que dicho polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia que se conserva entre los analitos o cepas de un analito objeto;

cZ es un miembro opcional del conjunto de perlas y es un polinucleótido inmovilizado en una perla en el que dicho polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de control que se amplifica a partir de un sujeto multicelular.

Preferentemente, el analito objeto es VPH y la secuencia de ADN de control es una secuencia de ADN genómica humana.

Por "complementaria", debe entenderse que el polinucleótido inmovilizado del reactivo debe hibridarse a un amplicón generado de acuerdo con métodos descritos en el presente documento bajo condiciones de baja rigurosidad. Preferentemente, el polinucleótido inmovilizado se debe unir a la muestra y estándar bajo condiciones de rigurosidad media y, lo más preferente, el polinucleótido inmovilizado se debe unir a la muestra y estándar bajo condiciones de alta rigurosidad.

La referencia en el presente documento a baja rigurosidad incluye y engloba formamida desde al menos aproximadamente el 0 hasta al menos aproximadamente el 15 % v/v (incluida formamida al 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 % y 14 % v/v de formamida) y sal desde al menos aproximadamente 1 M hasta al menos aproximadamente 2 M para hibridación, y sal de al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M para condiciones de lavado. En general, la baja rigurosidad es de desde aproximadamente 25-30 °C hasta aproximadamente 52 °C, tal como 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 y 52 °C. Se puede alterar la temperatura y se pueden usar temperaturas más altas para reemplazar formamida y/o para dar condiciones de rigurosidad alternativas. Se pueden aplicar condiciones de rigurosidad alternativas donde sea necesario, tales como rigurosidad media, lo que incluye y engloba formamida desde al menos aproximadamente el 16 % v/v hasta al menos aproximadamente el 30 % v/v, incluida formamida al 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 24 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 % y 30 % v/v, y sal desde al menos aproximadamente 0,5 M hasta al menos aproximadamente 0,9 M para hibridación, y sal de al menos aproximadamente 0,5 M hasta al menos aproximadamente 0,9 M para condiciones de lavado, o rigurosidad alta, que incluye y engloba formamida desde al menos aproximadamente el 31 % v/v hasta al menos aproximadamente el 50 % v/v y sal desde al menos aproximadamente 0,01 M hasta al menos aproximadamente 0,15 M para hibridación, y sal de al menos aproximadamente 0,01 M hasta al menos aproximadamente 0,15 M para condiciones de lavado. En general, el lavado se lleva a cabo a $T_m = 69,3 + 0,41 (G+C) \%$ (Marmur y Doty, J. Mol. Biol. 5:109, 1962). Sin embargo, la T_m de un ADN dúplex disminuye en 1 °C con cada incremento de un 1 % en el número de pares de bases con emparejamiento inadecuado (Bonner y Laskey, Eur. J. Biochem. 46:83, 1974). La formamida es opcional en estas condiciones de hibridación. En consecuencia, los niveles particularmente preferidos de rigurosidad se definen como sigue: baja rigurosidad es 6 x tampón SSC, SDS al 0,1 % p/v a 25-42 °C; una rigurosidad moderada es 2 x tampón SSC, SDS al 0,1 % p/v a una temperatura en el intervalo de 20 °C a menos de 65 °C; alta rigurosidad es 0,1 x tampón SSC, SDS al 0,1 % p/v a una temperatura de al menos 65 °C.

Las perlas, $B_1, \dots, B_n$, B_y , B_z , de los conjuntos de perlas de reactivo son cada una perlas que se pueden distinguir fisicoquímicamente. El término "se puede distinguir fisicoquímicamente" se refiere a cualquier característica física o química que permite que una perla, por ejemplo, B_1 se diferencie de otra perla, por ejemplo, B_2 . En consecuencia, las perlas que se pueden distinguir fisicoquímicamente permiten la diferenciación de reactivos particulares.

En determinadas realizaciones preferidas, la perla comprende una "micropartícula". Como será evidente para los expertos en la técnica, se puede usar casi cualquier material, homogéneo o de otro modo, para la micropartícula. Las micropartículas contempladas en el presente documento también pueden comprender más de una sustancia, y como mucho pueden comprender envolturas, aleaciones o mezclas de sustancias orgánicas e/o inorgánicas. Los materiales particularmente útiles que se pueden usar de acuerdo con la presente invención y que representan realizaciones preferidas de la presente invención incluyen materiales seleccionados de la lista que consiste en: sílice (por ejemplo: cuarzo o vidrio), látex, titanía, dióxido de estaño, itria, alúmina, y otros óxidos de metales binarios (tales como ZnO), perovskitas y otros óxidos de metales piezoeléctricos (tales como $BaTiO_3$), ZnS, sacarosa, agarosa y otras perlas poliméricas. En una realización particularmente preferida, la micropartícula comprende sílice.

En algunas realizaciones preferidas, el término "se puede distinguir fisicoquímicamente" se refiere a una diferencia medible en cualquiera de tamaño de perla, la presencia o ausencia de una marca ópticamente detectable particular y/o la intensidad de una marca ópticamente detectable.

Las perlas contempladas por la presente invención se pueden producir en cualquier forma tridimensional regular o irregular conveniente. Sin embargo, en general es práctico sintetizar esferas pequeñas o partículas esféricas. Dichas esferas o partículas esféricas también se denominan en el presente documento "perlas". En consecuencia, en realizaciones preferidas de la presente invención, las "micropartículas" de la presente invención son sustancialmente esféricas o esféricas o comprenden una "microesfera".

Aunque las perlas de la presente invención se pueden denominar "microesferas", el tamaño real de las partículas depende de varios factores y las partículas, realmente pueden o no comprender medidas en el intervalo de micrómetros. En algunas realizaciones preferidas, la perla comprende un diámetro (o medida equivalente en una partícula no esferoide) de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 30 μm , incluidos 300 nm, 350 nm, 400 nm, 450 nm, 500 nm, 550 nm, 600 nm, 650 nm, 700 nm, 750 nm, 800 nm, 850 nm, 900 nm, 950 nm, 1,0 μm , 1,1 μm , 1,2 μm , 1,3 μm , 1,4 μm , 1,5 μm , 1,6 μm , 1,7 μm , 1,8 μm , 1,9 μm , 2,0 μm , 2,1 μm , 2,2 μm , 2,3 μm , 2,4 μm , 2,5 μm , 2,6 μm , 2,7 μm , 2,8 μm , 2,9 μm , 3,0 μm , 3,1 μm , 3,2 μm , 3,3 μm , 3,4 μm , 3,5 μm , 3,6 μm , 3,7 μm , 3,8 μm , 3,9 μm , 4,0 μm , 4,1 μm , 4,2 μm , 4,3 μm , 4,4 μm , 4,5 μm , 4,6 μm , 4,7 μm , 4,8 μm , 4,9 μm , 5,0 μm , 5,1 μm , 5,2 μm , 5,3 μm , 5,4 μm , 5,5 μm , 5,6 μm , 5,7 μm , 5,8 μm , 5,9 μm , 6,0 μm , 6,1 μm , 6,2 μm , 6,3 μm , 6,4 μm , 6,5 μm , 6,6 μm , 6,7 μm , 6,8 μm , 6,9 μm , 7,0 μm , 7,1 μm , 7,2 μm , 7,3 μm , 7,4 μm , 7,5 μm , 7,6 μm , 7,7 μm , 7,8 μm , 7,9 μm , 8,0 μm , 8,1 μm , 8,2 μm , 8,3 μm , 8,4 μm , 8,5 μm , 8,6 μm , 8,7 μm , 8,8 μm , 8,9 μm , 9,0 μm , 9,1 μm , 9,2 μm , 9,3 μm , 9,4 μm , 9,5 μm , 9,6 μm , 9,7 μm , 9,8 μm , 9,9 μm , 10 μm , 11 μm , 12 μm , 13 μm , 14 μm , 15 μm , 16 μm , 17 μm , 18 μm , 19 μm , 20 μm , 21 μm , 22 μm , 23 μm , 24 μm , 25 μm , 26 μm , 27 μm , 28 μm , 29 μm , 30 μm . Más preferentemente, la perla comprende un diámetro (o medida equivalente en una partícula no esferoide) de entre 1 μm y 10 μm .

En una realización particularmente preferida, las perlas son perlas AmpaSand (marca comercial: Genera Biosystems) producidas por Genera Biosystems. Estas perlas están disponibles comercialmente y se describen en www.generabiosystems.com/generabiosystems/technology/AmpaSandBeads/. Sin embargo, la presente invención no se debe considerar de ningún modo limitada al uso específicamente de estas perlas.

Las perlas se pueden distinguir en base a la presencia o ausencia de una o más "marcas ópticamente detectables". Típicamente, una perla particular puede comprender 0, 1, 2, 3, 4, 5 marcas ópticamente detectables. Como se usa en el presente documento, el término "marca ópticamente detectable" se refiere a cualquier molécula, átomo o ion que emite fluorescencia, fosforescencia y/o incandescencia. Las marcas ópticamente detectables convenientes incluyen las que emiten en los intervalos de ultravioleta (intervalo de longitud de onda de aproximadamente 350 nm a aproximadamente 3 nm), visible (intervalo de longitud de onda de aproximadamente 350 nm a aproximadamente 800 nm, infrarrojo cercano (NIR) (intervalo de longitud de onda de aproximadamente 800 nm a aproximadamente 1500 nm) y/o infrarrojo (IR) (intervalo de longitud de onda de aproximadamente 1500 nm a aproximadamente 10 μ m). Sin embargo, debido a la facilidad de detección, en una realización particularmente preferida, la marca ópticamente detectable es detectable en el intervalo de longitud de onda visible.

En otras realizaciones preferidas de la invención objeto, la marca ópticamente detectable comprende una o más marcas seleccionadas de la lista que consiste en: un fluoróforo, una partícula semiconductor, una partícula de fósforo, una partícula dopada, o un nanocrystal o punto cuántico.

En determinadas realizaciones particularmente preferidas de la presente invención, la marca ópticamente detectable es un fluoróforo. Como se usa en el presente documento, el término "fluoróforo" se refiere a cualquier molécula que presente la propiedad de fluorescencia. Para los fines en el presente documento, el término "fluorescencia" se puede definir como la propiedad de una molécula de absorber luz de una longitud de onda particular y reemitir luz de una longitud de onda mayor. El cambio de longitud de onda se refiere a una pérdida de energía que tiene lugar en el proceso. El término "fluoróforo" puede englobar una gama de marcas ópticamente detectables tales como fluoróforos químicos y colorantes así como puntos cuánticos.

Las marcas ópticamente detectables particularmente convenientes que se pueden usar de acuerdo con la presente invención son partículas de semiconductores fluorescentes incrustadas. Estas partículas de marcas ópticamente detectables pueden ser tan pequeñas que sus propiedades y emisión sean dependientes del tamaño. Dichas partículas de marcas ópticamente detectables pequeñas se denominan en la técnica nanopartículas semiconductoras, puntos cuánticos, cables cuánticos, varillas cuánticas o nanocrystal o partículas Q. Sin embargo, como se usa en el presente documento, se debe entender que el término "punto cuántico" o "QD" engloba todas estas partículas. Además, las marcas ópticamente detectables que comprenden QD pueden comprender partículas aproximadamente esféricas o esferoides, o partículas esféricas o esferoides recubiertas. Sin embargo, el término QD no se debe considerar que de ningún modo se limite a una morfología esférica, esferoide, circular, cilíndrica o cualquier otra morfología de un "punto". Por ejemplo, como se usa en el presente documento, los QD también pueden comprender otras morfologías incluidas, entre otras, partículas de tipo varilla, elipsoidales, o de tipo varilla o elipsoidales recubiertas.

Los QD consisten en un núcleo cristalino de escala de nanómetros de material semiconductor; típicamente las versiones biológicamente activas están rodeadas por una envoltura protectora y un recubrimiento externo. Por ejemplo, los QD pueden comprender cristales semiconductores que son de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 30 nm de diámetro y puede contener aproximadamente 50-500.000 átomos dentro del cristal, incluidos cristales luminiscentes que comprenden materiales tales como ZnS, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe, PbS, PbSe, PbTe, HgS, HgSe, HgTe, Si, ZnO.

Los QD presentan fluorescencia con un espectro de absorción amplio y un espectro de emisión reducido. A diferencia de otros fluoróforos, que tienen distintos espectros de absorción, los QD absorben la luz en un intervalo espectral ancho, lo que permite que los puntos cuánticos se exciten con una gama de fuentes de luz, tales como láseres, lámparas de arco o LED. Además, se puede usar una colección de diferentes QD en múltiples aplicaciones usando sólo una única fuente de excitación. Sin embargo, los espectros de emisión para cada punto son muy reducidos, del orden de aproximadamente 30 nm, dependiendo el color exacto del diámetro y de la composición de la partícula. Además, el espectro de emisión reducido de los QD permite la resolución espectral de puntos adyacentes. Además de los beneficios anteriores, los QD también son relativamente fotoestables, incluso durante excitación intensa, y son más brillantes que los fluoróforos.

En vista de lo que antecede, también se debe entender que la presente invención abarca el uso de unos QD de diferente tamaño.

Además, la presente invención contempla QD que se tratan con procedimientos tales como tratamiento térmico, modificación de superficie, aleación, pasivación superficial o tapado con recubrimientos de superficie para permitir que el QD emita con rendimiento cuántico alto y para mejorar la fotoestabilidad durante largos periodos de tiempo.

Los QD también están disponibles comercialmente de compañías tales como Quantum Dot Corp. (QDC), que produce QD tales como el conjugado de estreptavidina Qdot [Marca registrada] 605, que contiene un núcleo seleniuro de cadmio que emite a 605 nm. También están disponibles conjugados de Qdot que emiten a 525, 565, 585 y 655 nm. Sin embargo, se debe entender que la presente invención no está limitada en modo alguno por la composición particular del QD (o cualquier otra marca ópticamente detectable) y cualquier QD (comercial o de otro modo) puede ser compatible con la presente invención.

También existen muchos colorantes fluorescentes que están disponibles en la técnica que se pueden usar como fluoróforos de acuerdo con la presente invención. Una propiedad importante de un colorante fluorescente u otro fluoróforo, que determine su potencial para su uso es la longitud de onda de excitación del fluoróforo; debe coincidir con las longitudes de onda disponibles de la fuente de luz. Sin embargo, muchos colorantes fluorescentes diferentes y otros fluoróforos serán familiares para los expertos en la técnica y la elección del marcador fluorescente de ningún modo limita la invención objeto. Colorantes fluorescentes particularmente convenientes que se pueden usar para el marcado de un sustrato incluyen los analizados anteriormente con respecto al marcado del amplicón de PCR. Sin embargo, cuando se eligen marcas fluorescentes, los espectros de emisión de la marca fluorescente usada para el/los agente(s) de unión debe ser distinta del espectro de emisión de la marca usada para el/los amplicón/amplicones.

Comúnmente se usan dos técnicas de tñido para marcar de forma fluorescente perlas y microesferas: tñido interno y tñido externo (marcado de superficie). Las dos técnicas producen perlas con propiedades únicas, cada una beneficiosa para diferentes aplicaciones. El tñido interno produce partículas extremadamente estables con emisiones de fluorescencia típicamente reducidas. A menudo, estas perlas presentan una resistencia mayor al fotoblanqueo. Puesto que el fluoróforo está dentro de las perlas, los grupos de superficie están disponibles para su uso en la conjugación de ligandos (proteínas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc.) a la superficie de la perla. Por este motivo, las perlas marcadas internamente se usan típicamente en detección de analitos y en aplicaciones de inmunoensayo. El marcado en superficie implica la conjugación del fluoróforo a la superficie de la perla. Debido a que los fluoróforos están sobre la superficie de la perla, pueden interaccionar con su entorno como los fluoróforos sobre la célula tñida. El resultado es un estándar de perla que presenta las mismas propiedades de excitación y emisión que las muestras de células tñidas, bajo una variedad de condiciones diferentes, tales como la presencia de contaminantes o cambios en el pH. La naturaleza "ambientalmente receptiva" de las perlas marcadas en superficie las hace idealmente adecuadas para imitar muestras biológicas. Las perlas marcadas externamente se usan con frecuencia como controles y estándares en varias aplicaciones utilizando detección por fluorescencia. Sin embargo, la presente invención contempla la asociación de una perla con una marca fluorescente por medio de cualquier medio.

Los términos "perlas fosforescentes", "perlas con fósforo" y "fósforos" se usan de forma intercambiable en el presente documento. Lo que constituye una marca ópticamente detectable fosforescente se entiende fácilmente por un experto en la técnica. Sin embargo, a modo de ejemplo, lo que de ningún modo limita la invención, los fósforos adecuados incluyen partículas pequeñas de ZnS, ZnS:Cu, óxido de Eu y otros fósforos usados en dispositivos de presentación.

Una marca ópticamente detectable que comprende una "perla dopada" puede incluir una partícula que comprende cantidades oclusivas de uno o más iones de elementos de transición interna, tales como Eu, Y, Yb, Sm y similares.

Como se usa en el presente documento, se debe entender que el término "marca ópticamente detectable" también engloba múltiples marcas ópticamente detectables, mezclas de marcas ópticamente detectables, nanocristales recubiertos, aleaciones y otras mezclas complejas que serán evidentes para el experto en la técnica. Se debe considerar que el uso de todas estas marcas ópticamente detectables está dentro del alcance de los métodos y agentes descritos en el presente documento.

Además, la marca ópticamente detectable del reactivo puede comprender una marca ópticamente detectable incorporada en la secuencia de polinucleótidos inmovilizada que está unida o asociada de otro modo con la perla, en lugar de que una perla esté asociada directamente con la perla por sí misma.

En general, las perlas están marcadas por el oligonucleótido de sonda o "etiqueta" inmovilizado. Esta etiqueta lleva una amina interna (NH₂) que después se modifica por conjugación con un éster de succinimidilo de un colorante. En el conjunto real, el colorante usado es BODIPY-TMR. Mezclando etiquetas marcadas y no marcadas y a continuación conjugando esta mezcla con las perlas, se pueden producir clases de perlas con diferentes niveles de marcador fluorescente. Las proporciones usadas convenientemente están en una serie de 1:5^x; esto es, las diferentes clases se producen usando la proporción de etiquetas no marcadas: marcadas. En general, esto se ejemplifica a continuación en la tabla 4.

Tabla 4 - Proporción de etiquetas no marcadas con respecto a marcadas

Clase	Cantidad rel. no marcada	Cant. rel. marcada
Todos	0	Todos
Ninguno	Todos	0
1/5	5	1
1/25	25	1
1/125	125	1

La marca ópticamente detectable se puede aplicar a una perla en un intervalo de concentraciones o intensidades, proporcionando de este modo otra base sobre la que las perlas particulares "se pueden distinguir fisioquímicamente". Por ejemplo, si se considera que la intensidad detectable máxima de la señal de una marca ópticamente detectable particular es del 100 %, la marca se puede aplicar a una gama de perlas para dar intensidades de un 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %.

En una realización, el conjunto de perlas de reactivos comprende perlas de 3,0 μm , 3,5 μm , 4,1 μm , 5,0 μm , 5,6 μm y 6,8 μm , en el que las perlas de diámetro 3,0 μm , 3,5 μm y 4,1 μm están marcadas a un 0 % y 100 %, las perlas de diámetro 5,0 están marcadas a un 0 %, 100 % y 20 % y las perlas de diámetro 5,6 μm y 6,8 μm están marcadas a un 0 %, 100 %, 20 % y 4 %.

En otra realización, el conjunto de perlas de reactivos comprende perlas de 3,0 μm , 3,5 μm , 3,77 μm , 5,0 μm , 5,6 μm y 6,8 μm . Todos los tamaños de perla, (excepto para 3,0 μm que se divide por el nivel cero y el nivel alto de TMR), se dividen de acuerdo con su respectivo nivel cero, nivel medio y nivel alto de TMR.

En otras realizaciones, los niveles de TMR de establecen de modo que durante la conjugación de perla a oligo, se usen oligos con proporciones definidas de oligo total con respecto a marcados con flúor para determinar agrupaciones de TMR discretas. Por ejemplo, los niveles cero de TMR tienen oligos no marcados incluidos en conjugación; los niveles altos de TMR tienen una proporción de oligo total con respecto a marcado con flúor de 3:1 de oligos incluida en conjugación; y los niveles medios de TMR tiene una proporción de oligo total con respecto a marcado con flúor de un 150:1 a un 80:1 incluida en conjugación, dependiendo del tamaño de perla.

El componente de polinucleótido inmovilizado del reactivo, por ejemplo, cX_n , cY y/o cZ se puede unir a una perla usando cualquier medio conveniente.

El polinucleótido inmovilizado se puede encapsular en perlas durante su producción o se puede unir a su superficie post-producción. El método de elección usado para asociar el polinucleótido con la perla dependerá del material usado, como se establecerá fácilmente por el experto en la técnica. Además, se pueden realizar otros tratamientos, incluida la silanización (recubrimiento del sustrato con silanos), sobre las perlas antes de la unión del polinucleótido para incrementar la unión de dicho polinucleótido a la perla.

En general, las perlas se pueden recubrir con cualquier compuesto que se una de forma covalente, o se adsorba de otro modo, a la superficie de la perla, y además, el reactivo también debe tener un resto químico para la unión de un polinucleótido, tal como un grupo tiol, amina o carboxilo. Los ejemplos no limitantes de compuestos con estas características incluyen silanos terminados en amino tales como amino-propiltrimetoxisilano y aminopropiltriethoxisilano, así como silanos terminados en tiol tales como tio-propiltrimetoxisilano y tio-propiltriethoxisilano. Además de los silanos, los compuestos tales como poli-L-lisina que se unen de forma no covalente a la superficie de vidrio y absorben de forma electrostática los grupos fosfato del polinucleótido también están dentro del alcance de la presente invención. Por lo tanto, otros compuestos, incluidos otros silanos adecuados para la unión de un polinucleótido a una superficie se identificarán fácilmente por el experto en la técnica, y la presente invención no se limita por la elección del compuesto.

El polinucleótido se puede unir a la perla usando cualquier medio conveniente; esto se realiza típicamente por adsorción física o unión química. Además, las perlas se pueden cubrir adicionalmente con un agente que promueva o incremente la adsorción o la unión del polinucleótido a la superficie de la perla, tal como amino-silanos. Sin embargo, otros agentes que realizan esta función se identificarán fácilmente por expertos en la técnica. En algunas otras realizaciones, el polinucleótido se conjuga de forma covalente a la perla por un grupo acridita del oligo que reacciona con un grupo tiol de la perla.

En otra realización, la molécula de ácido nucleico se une a la perla por medio del Universal Anchoring System (UAS) (marca registrada: Genera Biosystems). En resumen, este sistema implica el uso de una molécula de ácido nucleico "puente" para ligar una secuencia de "etiqueta" de ácido nucleico sobre el sustrato con una secuencia diana. La secuencia "puente" es parcialmente complementaria a la secuencia de la etiqueta y parcialmente complementaria a

la secuencia diana, de modo que la secuencia pueden se puede unir a las secuencias tanto de la etiqueta como de la diana y sujetarlas en el alineamiento de modo que las secuencias de etiqueta y diana se puedan ligar usando una ligasa. El UAS también está disponible comercialmente y se describe en detalle en www.generabiosystems.com/generabiosystems/technology/UAS/. Sin embargo, no se debe considerar que la presente invención limite de ningún modo este método particular de ligar una molécula de ácido nucleico a un sustrato.

La determinación de si se ha producido la unión entre un amplicón y un reactivo se puede realizar usando cualquier metodología que permita la localización de una marca de amplicón unida a un reactivo que se puede distinguir fisioquímicamente particular. En una realización particularmente preferida, se usa citometría de flujo.

La citometría de flujo se puede definir como una tecnología para medir propiedades de partículas o células mientras se mueven, o fluyen, en suspensión líquida. Se puede hacer una analogía con un artículo más familiar de equipo de laboratorio, el microscopio, para describir adicionalmente esta tecnología. La mayoría de los microscopios tienen los siguientes componentes:

Una fuente de luz

El microscopio típico usa una bombilla para iluminar el objeto. En el citómetro de flujo, la fuente de luz a menudo es un láser. Se usan láseres porque proporcionan un haz concentrado e intenso de luz monocromática. El carácter monocromático de la luz es especialmente importante en la realización de medidas de fluorescencia.

La fase

En un microscopio, la fase es movable para permitir el paso del objeto al campo de visión de un objetivo. En citómetro de flujo, las células o partículas están en suspensión líquida. El líquido fluye en respuesta a la presión de aire, pasa por delante del objetivo, llevando así las células o partículas a través del campo de visión.

La lente

Tanto en el microscopio como en el citómetro de flujo, la lente recoge luz del objeto.

Los filtros

Algunos microscopios tienen filtros para seleccionar las características de la luz que son más importantes para el observador. Esto es particularmente cierto en los microscopios de fluorescencia. En fluorescencia, las moléculas de colorante se excitan por luz de una longitud de onda característica, que a continuación producen luz emitida de una longitud de onda más larga. Los filtros retiran la luz de excitación para permitir que la luz de emisión se observe o se mida.

Los detectores

En un microscopio, el detector de luz es el observador. El citómetro de flujo usa detectores de luz altamente sensibles denominados tubos fotomultiplicadores (PMT). Los detectores deben poder medir los destellos breves de luz emitida de las células o partículas que se mueven de una en una en cada tiempo a través del campo de visión del objetivo a velocidades de hasta varios miles por segundo.

La mayoría de los citómetros de flujo pueden medir tanto dispersión de luz como fluorescencia.

En determinadas realizaciones preferidas, las perlas se detectan y/o se clasifican de acuerdo con los métodos de la presente invención usando citometría de flujo. La presente invención, sin embargo, no se limita de ningún modo al método o aparato de citometría de flujo particular descrito anteriormente en el presente documento. Este ejemplo se proporcionó sólo con fines ilustrativos y la presente invención no se limita a un instrumento o método de acuerdo con el ejemplo proporcionado.

Usando citometría de flujo, el tamaño de una perla dada se puede determinar por dispersión de luz del objeto.

La dispersión de luz es la interacción de luz y materia. Todos los materiales, incluidas las perlas, dispersarán luz. Se compone en gran parte de luz que se refleja o se refracta. La posición desde la que se ve un objeto a menudo determina lo que se puede decir sobre él. En el citómetro de flujo, los detectores de dispersión de luz normalmente están situados opuestos al láser (con relación a la célula o partícula), y a un lado del láser, en línea con la intersección de flujo de fluido/haz de luz. Las medidas realizadas por estos detectores se denominan dispersión de luz directa y dispersión de luz lateral, respectivamente.

La dispersión de luz directa proporciona alguna información sobre el tamaño relativo de las células o partículas individuales, mientras que la dispersión de luz lateral proporciona alguna información sobre la granularidad relativa

de las perlas individuales. A menudo se usan en combinación para distinguir las diferentes categorías principales de leucocitos en sangre de mamífero no separada, pero también son útiles en una gran variedad de otros ensayos, tales como la determinación del tamaño de una micropartícula.

Los inventores de la presente invención han determinado que la citometría de flujo puede distinguir entre perlas de aproximadamente 3,0 μm , aproximadamente 3,5 μm , aproximadamente 4,1 μm , aproximadamente 5,0 μm , aproximadamente 5,6 μm y aproximadamente 6,8 μm de diámetro. Los inventores de la presente invención también han determinado que la citometría de flujo puede distinguir entre perlas de aproximadamente 3,0 μm , aproximadamente 3,5 μm , aproximadamente 3,77 μm , aproximadamente 5,0 μm , aproximadamente 5,6 μm y aproximadamente 6,8 μm de diámetro. Se pueden distinguir aún otras clases de perlas, tales como de entre 5,0 y 5,6 y 5,6 y 6,8. En consecuencia, los inventores de la presente invención han identificado que la citometría de flujo puede diferenciar al menos hasta 6 tamaños diferentes de perlas.

Además de la detección por tamaño, típicamente los citómetros de flujo tienen uno o más láseres y detectores para la detección de fluorescencia en una muestra. La fluorescencia es la propiedad de una molécula de absorber luz de una longitud de onda particular y reemitir luz de una longitud de onda mayor. El cambio de longitud de onda se refiere a una pérdida de energía que tiene lugar en el proceso. Es una característica que hace que la fluorescencia sea extremadamente útil: se pueden usar filtros para excluir la luz de excitación del detector de luz o del observador. Por tanto, la única luz medida u observada se origina del fluoróforo. La interferencia del fondo o la luz desviada que choca con los detectores es extremadamente baja.

Existen muchos colorantes fluorescentes que son útiles para la citometría de flujo. Se unen a una variedad de componentes citoquímicos, tales como ácidos nucleicos; proteínas; receptores de membranas celulares, nucleares y citoplásmicos específicos; moléculas iónicas intracelulares; y muchos más. Una propiedad clave de un colorante fluorescente que determina su potencial para su uso en un ensayo citométrico de flujo es la longitud de onda de excitación, es decir, debe coincidir con las longitudes de onda disponibles de la fuente de luz.

En otros aspectos, se divulgan métodos para diagnosticar una infección por un analito patogénico en un sujeto, comprendiendo dicho método:

- (i) obtener una muestra biológica del sujeto que comprende putativamente dicho analito patogénico,
- (ii) aislar ácido nucleico de dicha muestra,
- (iii) amplificar el ácido nucleico de dicha muestra usando cebadores que generan un amplicón que es distinto para dicho analito o una cepa particular de dicho analito,
- (iv) amplificar opcionalmente una secuencia de ácido nucleico de control del sujeto,
- (v) efectuar opcionalmente el marcado del/de los amplicón/amplicones enumerados en las etapas (iii) y/o (iv),
- (vi) hibridar el/los amplicón/amplicones marcados a un conjunto de perlas de reactivos en los que cada miembro del conjunto de perlas comprende una molécula de ácido nucleico que tiene complementariedad con una secuencia de nucleótidos del analito o una cepa particular del analito o una secuencia de nucleótidos de control, unida o asociada de otro modo con una perla que se puede distinguir fisiológicamente, y
- (vii) determinar a qué reactivo se ha unido un amplicón;

en el que la asociación de un amplicón con un reactivo particular es indicativa de una infección por el analito en el sujeto.

En otros aspectos, la hibridación se produce en presencia de al menos una secuencia de oligonucleótidos señal.

En otros aspectos, la hibridación se produce en presencia de al menos una secuencia de oligonucleótidos de bloqueo.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere cualquier organismo que pueda ser susceptible de infección por otro analito. Como tal, un "sujeto" incluye, pero no se limita a animales, plantas, hongos y bacterias (que se pueden infectar por un bacteriófago). Como se usa en el presente documento, el término "animal" incluye preferentemente un mamífero y más preferentemente un primate incluido un primate inferior y aún más preferentemente, un ser humano. Sin embargo, el término "animal" también incluye específicamente especies de granja tales como reses, caballos, ovejas, cerdos, cabras y asnos así como animales de laboratorio. Los ejemplos de animales de ensayo de laboratorio incluyen ratones, ratas, conejos, cobayas y hámsteres. Los conejos y animales roedores, tales como ratas y ratones, proporcionan un sistema de prueba o modelo animal conveniente como lo hacen los primates y primates inferiores. También están contemplados animales no mamíferos tales como

especies aviares, pez cebra, anfibios (incluidos sapos de caña) y especies *Drosophila* tales como *Drosophila melanogaster*.

El "sujeto" también puede ser distinto de animal, tal como una planta. El término "planta" incluye específicamente plantas de valor agrícola tales como plantas de cereales (por ejemplo, trigo, cebada, avena, centeno, triticale y maíz), arroz, árboles frutales (por ejemplo, manzanos, bananos, mangos y naranjos), caña de azúcar, plantas de cultivo horticultural horticolas (por ejemplo, patatas, zanahorias y cebollas) y similares.

La presente invención proporciona métodos *in vitro* para diagnosticar infección por VPH en un sujeto humano, comprendiendo dicho método:

(i) aislar el ácido nucleico de una muestra se había obtenido a partir de un sujeto humano; que comprende putativamente VPH

(ii) amplificar el ácido nucleico de dicha muestra usando cebadores que generan un amplicón que es distinto para dicho analito o una cepa particular de dicho analito;

(iii) amplificar opcionalmente una secuencia de ácido nucleico de control del ADN genómico del sujeto humano;

(iv) efectuar opcionalmente el marcado del/de los amplicón/amplicones enumerados en las etapas (ii) y/o (iii);

(v) hibridar el/los amplicón/amplicones marcados a un conjunto de perlas de reactivos en los que cada miembro del conjunto de perlas comprende una molécula de ácido nucleico que tiene complementariedad con una secuencia de nucleótidos de VPH o una cepa de VPH particular o una secuencia de nucleótidos de control, unida o asociada de otro modo con un sustrato que se puede distinguir fisicoquímicamente en el que la hibridación se produce en presencia de al menos una secuencia de oligonucleótidos de bloqueo; y

(vi) determinar a qué reactivo se ha unido un amplicón;

en el que la asociación de un amplicón con un reactivo particular es indicativa de una infección por VPH en el sujeto humano.

En otros aspectos, la hibridación se produce en presencia de al menos una secuencia de oligonucleótidos señal.

En otros aspectos, la hibridación se produce en presencia de al menos una secuencia de oligonucleótidos de bloqueo.

En algunos aspectos, la presente invención también contempla métodos para determinar el riesgo de que un sujeto humano desarrolle una enfermedad asociada con una o más cepas de VPH, comprendiendo dicho método:

(i) aislar el ácido nucleico de una muestra se había obtenido a partir de un sujeto humano, que comprende putativamente VPH

(ii) amplificar el ácido nucleico de dicha muestra usando cebadores que generan un amplicón que es distinto para dicho analito o una cepa particular de dicho analito;

(iii) amplificar opcionalmente una secuencia de ácido nucleico de control del ADN genómico del sujeto humano;

(iv) efectuar opcionalmente el marcado del/de los amplicón/amplicones enumerados en las etapas (ii) y/o (iii);

(v) hibridar el/los amplicón/amplicones marcados a un conjunto de perlas de reactivos en los que cada miembro del conjunto de perlas comprende una molécula de ácido nucleico que tiene complementariedad con una secuencia de nucleótidos del VPH o una cepa de VPH particular o una secuencia de nucleótidos de control, unida o asociada de otro modo con un sustrato que se puede distinguir fisicoquímicamente; y

(vi) determinar a qué reactivo se ha unido un amplicón;

en el que la asociación de un amplicón con un reactivo particular que comprende un polinucleótido que es complementario a una cepa de VPH asociada con una enfermedad particular, es indicativa de un incremento en el riesgo de dicha enfermedad en el sujeto.

En otros aspectos, la hibridación se produce en presencia de al menos una secuencia de oligonucleótidos señal.

En otros aspectos, la hibridación se produce en presencia de al menos una secuencia de oligonucleótidos de bloqueo.

Cuando se produce el marcado de los amplicones como se indica en la parte (v), se marcan tanto los amplicones como las perlas.

Las enfermedades ejemplares asociadas con una o más cepas de VPH particulares incluyen las presentadas en la tabla 3. En consecuencia, en algunos aspectos, la presente invención pro+ métodos para diagnosticar un incremento en el riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad particular identificando específicamente qué cepa VPH está infectando al sujeto. En determinadas realizaciones particularmente preferidas, los métodos están adaptados para determinar el riesgo de un sujeto humano de desarrollar cáncer cervical.

La presente divulgación comprende además kits de diagnóstico para su uso de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, incluido diagnosticar una infección por VPH en un sujeto a humano y/o evaluar el riesgo de un sujeto humano de desarrollar una enfermedad asociada con el VPH, incluido cáncer cervical. Los kits comprenden un conjunto de perlas de reactivos de los que cada uno comprende un polinucleótido que es complementario con una secuencia de nucleótidos de una cepa de VPH particular, unida o asociada de otro modo con un sustrato que se puede distinguir fisicoquímicamente. Opcionalmente, los kits también pueden comprender cebadores que se unen a secuencias conservadas entre diferentes cepas de VPH, pero generan un amplicón que comprende distintas secuencias de nucleótidos para cada cepa de VPH en los que el amplicón generado es putativamente complementario con un polinucleótido unido a o asociado de otro como con una o más perlas que se pueden distinguir fisicoquímicamente del kit.

En alguna realización, los conjuntos de perlas de reactivos comprenden al menos grupos de perlas, que comprende cada uno un diámetro de uno cualquiera de aproximadamente 3,0 μm , aproximadamente 3,5 μm , aproximadamente 4,1 μm , aproximadamente 5,0 μm , aproximadamente 5,6 μm y aproximadamente 6,8 μm . En otra realización preferida, cada grupo de tamaño de perlas comprende uno o más subgrupos de microesferas cada uno con una marca fluorescente en un intervalo de intensidades diferentes. La marca fluorescente es TMR y se puede aplicar a intensidades de aproximadamente el 0 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 100 %.

En otras realizaciones, los conjuntos de perlas de reactivos comprenden al menos grupos de perlas, que comprende cada uno un diámetro de uno cualquiera de aproximadamente 3,0 μm , aproximadamente 3,5 μm , aproximadamente 3,77 μm , aproximadamente 5,0 μm , aproximadamente 5,6 μm y aproximadamente 6,8 μm . Los niveles de TMR de establecen de modo que durante la conjugación de perla a oligo, se usen oligos con proporciones definidas de oligo total con respecto a marcados con flúor para determinar agrupaciones de TMR discretas. Por ejemplo, los niveles cero de TMR tienen oligos no marcados incluidos en conjugación; los niveles altos de TMR tienen una proporción de oligo total con respecto a marcado con flúor de 3:1 de oligos incluida en conjugación; y los niveles medios de TMR tiene una proporción de oligo total con respecto a marcado con flúor de un 150:1 a un 80:1 incluida en conjugación, dependiendo del tamaño de perla.

En otras realizaciones, los kits comprenden los cebadores GP5+ y GP6+ y opcionalmente los cebadores MLC1_F y MLC1_R.

En otras realizaciones, los kits comprenden los cebadores GP5d2+ y T7aGP6d+ y opcionalmente los cebadores mlc1_95f y T7amlc1_275r.

En otras realizaciones, los kits comprenden los cebadores GP5d3+ y T7aGP6d+* y opcionalmente los cebadores mlc1_95f y T7amlc1_275r.

La presente invención incluye realizaciones adicionales de pares de cebadores en las que los cebadores individuales directos (por ejemplo, GP5+, GP5d2+, etc.) e inversos (por ejemplo, GP6+, T7aGP6d+) descritos en el presente documento se combinan entre sí.

Los kits también pueden estar en forma de chips o soportes de fase sólida, denominados comúnmente biochips. Todos o parte de los reactivos usando en el ensayo objeto se pueden incorporar en un biochip o miniaturizar en un nanoensayo. Aunque la citometría de flujo es particularmente útil en la medida de los rendimientos del ensayo objeto, los biochips se pueden usar para medir o automatizar otras señales tales como las asociadas con ensayos en modo de galería de susurros.

A pesar de las intensidades fluorescentes en un aspecto preferido del método de multiplexación, otras formas de identificación están englobadas por la presente invención. Un método alternativo de este tipo incluye la detección en modo de galería de susurros (WGM). En esta realización, un marcador fluorescente se incorpora en perlas de un subconjunto o se incorpora o se une a ADN sobre la superficie de las perlas. Este marcador fluorescente puede excitar los WGM con un láser o fuente de luz blanca desenfocada o con fuente de luz blanca desenfocada filtrada.

Los WGM permiten que sólo determinadas longitudes de onda de luz se emitan desde la partícula. El resultado de este fenómeno es que las bandas de emisión anchas normales (de 10-100 nm de ancho) de, por ejemplo, un fluoróforo se restrinjan y aparezcan como una serie picos agudos que corresponden eficazmente a patrones de luz

de modo permanente dentro de la partícula. De acuerdo con la presente invención, se ha determinado que el perfil en WGM es extremadamente sensible a cambios en la superficie de la partícula microesferoide y que el perfil en WGM cambia cuando la partícula microesferoide interacciona con analitos o moléculas dentro de su entorno.

En consecuencia, otros aspectos de la presente invención contemplan métodos de detección de un analito tal como un amplicón de una cepa de VPH que comprenden una secuencia específica de cepa, comprendiendo dicho método poner en contacto al menos un conjunto de partículas microesferoides con una muestra que comprende putativamente dicho analito, en los que cada partícula dentro de un conjunto de partículas microesferoides comprende una marca ópticamente detectable y un compañero de unión putativa inmovilizado de dicho analito (por ejemplo, un cebador o sonda que puede unir, capturar o inmovilizar de otro modo un amplicón de una cepa de VPH) en el que cada conjunto de partículas tiene un perfil de WGM definido, en el que la unión de dicho analito a dicho compañero de unión inmovilizado da como resultado un cambio en dicho perfil de WGM de dicho al menos un conjunto de partículas microesferoides que es indicativo de la presencia de dicho analito.

Los métodos de la presente invención se pueden aplicar para detectar la modulación en el perfil de WGM de una partícula microesferoide en los que dicha modulación resulta de la detección de la unión o asociación de otro modo de moléculas en una muestra para la unión potencial de partículas inmovilizadas en la superficie de la partícula microesferoide. La detección de reacciones de unión entre un analito y su compañero de unión en base a cambios sensibles en perfiles de WGM permite la identificación y el aislamiento de los analitos.

Una característica de la presente invención es que las partículas microesferoides se pueden excitar con una amplia gama de fuentes de luz, lo que facilita la medida en muchos perfiles de WGM diferentes.

Una "marca ópticamente detectable" puede ser cualquier molécula, átomo o ion que emite fluorescencia, fosforescencia y/o incandescencia. En algunas otras realizaciones preferidas de la presente invención, la marca ópticamente detectable es un fluoróforo, que puede englobar una gama de marcas ópticamente detectables tales como fluoróforos y colorantes químicos así como puntos cuánticos.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona al menos una partícula microesferoide que comprende una partícula de látex o sílice que se vuelve de 100 μm de diámetro, se marca con una marca ópticamente detectable, tal como un fluoróforo o punto cuántico, comprendiendo además la partícula un compañero de unión putativa de un analito que se va a detectar. Un ejemplo es una molécula de ácido nucleico de captura que se puede unir a un amplicón de VPH generado por la amplificación usando dos cebadores para una región conservada del genoma del VPH que flanquea una región específica de cepa. La marca ópticamente detectable se puede detectar a longitudes de onda visible y la partícula microesferoide presenta uno o más perfiles de WGM. Uno o más de los perfiles de WGM de la partícula microesferoide modula de forma detectable cuando el analito interacciona con el compañero de unión inmovilizado sobre la partícula. Cualquier cambio de este tipo en el perfil WGM es indicativo de la presencia de un analito que se ha unido a su compañero de unión.

Se pueden incluir oligos de bloque con las perlas durante la hibridación del amplicón a las perlas. Los oligos de bloque tienen puntos deliberados de diferencia de las correspondientes regiones de unión perla-sonda de los amplicones monocatenarios. Pueden ser un oligo de bloque para cada perla-sonda en la mezcla. Se pretende que los oligos de bloque actúen como filtros montados apropiadamente. En el contexto de una desnaturalización térmica seguido de una disminución lenta en la temperatura, los acontecimientos de hibridación más eficaces se producen en primer lugar. Los amplicones específicos de tipo se unen a la perla-sonda emparejada de acuerdo con el tipo desde el principio. Los oligos de bloque se pueden unir a y saturar las perlas-sondas más abajo del perfil térmico. Esto puede evitar que se produzcan acontecimientos de hibridación de tipo cruzado (en los que entre tipos hay más puntos de diferencia en regiones de unión a sonda en comparación con los oligos de bloque) u otras hibridaciones no específicas tales como amplicones, incluidos productos cebador-dímero. Un oligo de bloque puede estar presente para el control en humanos así como los tipos VPH. Los ejemplos de oligos de bloque se describen en la tabla 2 anterior. El nivel de similitud entre los oligos de bloque y la secuencia complementaria con la región de sonda de perla específica de tipo (para la que se diseña el bloqueo) puede ser de entre el 40 % y el 95 %. Otro ejemplo del nivel de similitud es entre el 75 % y el 85 %.

Se pueden usar oligos de señal como alternativas al uso de cebadores de PCR marcados directamente con flúor para generar la señal. Los oligos de señal son sondas marcadas con flúor que se unen a productos de amplicón en un sitio diferente de la región perla-sonda para proporcionar un complejo perla-sonda/amplicón/oligo de señal después de la hibridación. Las ventajas de su uso serían: excluir el requisito del marcado con flúor (y manipulación excesiva) del cebador de PCR durante la producción, uso de mucho menos oligo marcado con flúor para una sensibilidad equivalente (y beneficios de coste), reducción del fondo de flúor de modo que se logre una mayor sensibilidad sin etapas de lavado (beneficios de riesgo y manipulación), incremento en la sensibilidad en ausencia de oligos de bloque debido a un nivel extra de 'anidado' en el complejo de hibridación, y uso potencial de más producto de PCR en las etapas de 'detección'. Todos estos beneficios facilitarían un enfoque de 'tubo individual'. Los ejemplos de oligos de señal se describen en la tabla 2 anterior.

De forma alternativa, se puede usar un colorante específico de ADN bicatenario, tal como el colorante SYBR Green I como un modo de unir la señal al amplicón sobre la perla junto a o en lugar de los oligos de señal.

La presente invención se describe adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Diagnóstico de VPH - aislamiento y purificación de ADN

En la figura 1 se muestra una perspectiva general del protocolo de extracción de ADN usado para aislar ADN del método de diagnóstico de VPH.

Como se muestra en la figura 2, se usó PCR para amplificar la muestra de ADN. Se usaron los cebadores GP5d2+ y T7aGP6d+ para generar un amplicón para cualquier cepa de VPH que estaba presente en la muestra de ADN. El cebador T7aGP6d+ comprendía una marca fluorescente, específicamente A647 para permitir la visualización posterior de la unión a amplicón a los agentes de unión. Los amplicones víricos generados comprendían tanto una región conservada (Y) que se conserva entre todas las cepas de VPH examinadas como una región que es variable (es decir, específica de cepa) entre cepas del VPH, X_n , donde n representa una región variable asociada con cada cepa de VPH. Los compañeros de unión inmovilizados sobre perlas se unen específicamente al genoma específico de cepa de VPH.

Además, también se generó un amplicón a partir del ADN genómico del sujeto humano usando los cebadores mlc1_95f y T7amlc1_275r para servir como control. En este caso, el cebador T7amlc1_275r también llevaba una marca A647.

Ejemplo 2

Diagnóstico de VPH - Detección Multiplex

Se hibridaron los amplicones generados en el ejemplo 1 a una matriz de agentes de unión, llevando cada uno un polinucleótido que es complementario a la región variable del amplicón vírico putativo generado de cada una de las cepas del VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67 y 68 (X_1 a X_{16}). Véase la tabla 2 para las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos de captura inmovilizados en las perlas. Además, la matriz puede comprender adicionalmente un agente de unión que comprende un polinucleótido que es complementario a la región conservada de los amplicones víricos de VPH (Y). Finalmente, se incluye un agente de unión que comprende un polinucleótido que es complementario a la secuencia del amplicón de control humano. El ácido nucleico de captura puede ser ADN o ARN. Si se usa ARN, se puede requerir una transcriptasa inversa para generar ARN del amplicón de ADN.

Cada uno de los agentes de unión en la matriz comprende una microesfera o perla con un tamaño distinto y una intensidad distinta de marca fluorescente (TMR). Las perlas que comprenden diámetros de 3,0 μm , 3,5 μm , 3,77 μm , 5,0 μm , 5,6 μm y 6,8 μm se pueden diferenciar entre sí usando citometría de flujo, como se muestra en la figura 4.

Para cada tamaño de microesfera dado, se incorporó una marca fluorescente (TMR) en intensidades relativas del 0 %, aproximadamente 150-80:1 (medio), y aproximadamente 3:1 (alto). Estas intensidades de marca se podían distinguir claramente usando citometría de flujo.

Ejemplo 3

Comparación del método de detección Multiplex con diagnóstico de VPH tradicional

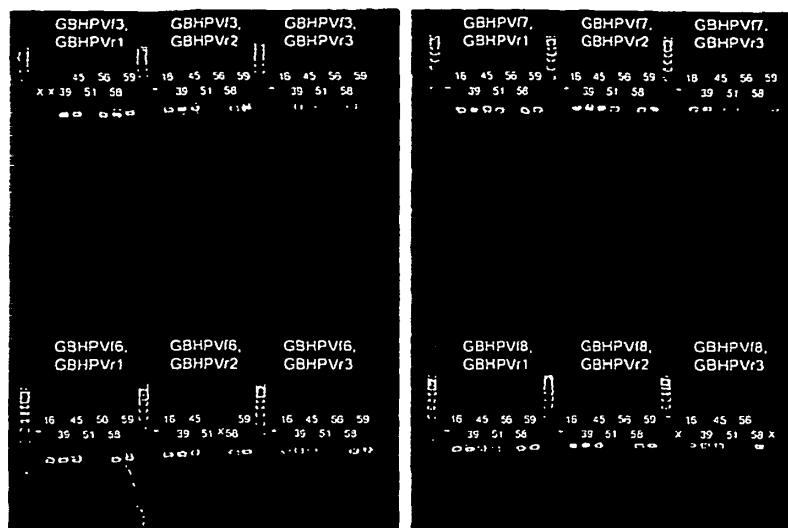
La tabla 5, a continuación, proporciona una visión general que compara el método de detección de VPH multiplex de la presente invención con el proporciona histológico actual para el diagnóstico de VPH.

Tabla 5

Comparación de métodos de diagnóstico de VPH			
Método de diagnóstico de VPH	Rendimiento	Informe	Controles
Presente invención	1600 por día, por instrumento	Las 13 cepas de "alto riesgo" identificadas individualmente	control interno, control positivo, control de ADN humano
Método basado histológico	350 por día	Clase de "alto riesgo" generalmente identificada	sin control interno, control positivo de "bajo riesgo", control positivo de "alto riesgo"

Ejemplo 4*Prueba de sensibilidad para metodología de sonda*

5



Análisis electroforético en gel de agarosa de productos de PCR después de la amplificación de plásmidos que contienen inserción específica de tipo de VPH usando varias combinaciones de cebadores

10

Se cargaron cinco microlitros de cada producto junto con carriles que contenían 5 microlitros de la escalera de ADN HyperladderIV. Las reacciones se sometieron a plantilla con 40000 copias de plásmido específico de tipo (los números en los carriles indican el tipo) y se sometieron a 40 ciclos de amplificación usando una temperatura de apareamiento de 44 °C. Una 'x' en los carriles indica reacciones no analizadas debido a la pérdida evaporativa durante la PCR. Un '-' en los carriles indica controles sin plantilla. Se usaron 200 o 100 copias de plásmidos específicos de tipo junto con ADN genómico humano Jurkat para someter a plantilla PCR que empleaban GBHPVf3+ y GBHPVr1 multiplexados con MLC1_95f y T7aMLC1_275r. Se realizaron cuarenta y ocho ciclos de amplificación usando una temperatura de apareamiento de 44 °C. Se realizó el análisis por citometría de flujo después de digestión por lambda exonucleasa e hibridación a perlas de sonda PapType. Los controles sin plantilla proporcionaron resultados negativos entre tipos. Todos los tipos probados: 6, 11, 16, 18, 31, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 proporcionaron resultados positivos usando 200 copias de plásmidos específicos de tipo. Todos los tipos anteriores excepto 51 y 59 proporcionaron resultados positivos usando 100 copias de plásmidos específicos de tipo, lo que indica un sistema muy sensible y relativamente objetivo.

15

20

25

Cuando se usan intervalos en el presente documento para propiedades físicas, tales como temperatura o número de nucleótidos en una secuencia, se pretende que todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y realizaciones específicas de los mismos estén incluidas.

30

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible a variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Se debe entender que la invención incluye todas estas variaciones y modificaciones. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos referidos o indicados en esta memoria descriptiva, de forma individual o colectiva, y cualquiera o todas las combinaciones de cualquiera o más de dichas etapas o características.

35

Bibliografía

Bonner y Laskey, Eur. J. Biochem. 46:83, 1974

Chadwick et al., J. Virol. Methods 70:59-70, 1998

40

Chan y Fox, Rev. Med Microbiol. 10:185-196, 1999

Compton, Nature 350:91-92, 1991

45

Demidov y Broude (Eds.), "DNA Amplification: Current Technologies and Applications", Horizon Bioscience, 2004

Gearhart et al., www.emedicine.com/MED/topic 1037.htm, 2004

- Guatelli et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 87:1874-1878, 1990
- 5 Hill, J. Clin. Ligand Assay 19:43-51, 1996
- Kievits et al., J. Virol. Methods 35:273-286, 1991
- Kuske et al., Appl. Environ. Microbiol. 64(7):2463-2472, 1998
- 10 Lizardi et al., Biotechnology 6:1197-1202, 1988
- Lyamichev et al., Nat. Biotechnol. 17:-292-296, 1999
- Marmur y Doty, J. Mol. Biol. 5:109, 1962
- 15 Nelson y Krawetz, Anal. Biochem. 207(1):97-201, 1992
- Pawlotsky et al., J. Virol. Methods 79:227-235, 1999
- 20 Ryan et al., Mol. Diagn. 4:135-144, 1999
- Speel, Histochem. Cell Biol. 112:89-113, 1999
- Todd et al., J. AIDS Hum. Retrovirol. 10:S35-S44, 1995
- 25 Documento WO 2006/060872 A1

REIVINDICACIONES

1. Un conjunto de perlas para detectar una cepa del VPH y/o para diferenciar entre dos o más cepas del VPH, en los que el conjunto de perlas comprende una pluralidad de familias o una pluralidad de subconjuntos de perlas que tienen:

(a) al menos dos subconjuntos de perlas, en los que cada subconjunto de perlas se puede distinguir fisicoquímicamente de cualquier otro subconjunto de perlas en base, al menos, al tamaño, o

(b) al menos un subconjunto de perlas que tienen al menos dos familias, en el que las perlas en un subconjunto de perlas son homogéneas en tamaño unas con respecto a otras, y se pueden distinguir fisicoquímicamente en dos o más familias de perlas en base al nivel de marcado que contiene cada una, o

(c) una combinación de dichas familias de perlas y dichos subconjuntos de perlas;

y en los que:

las perlas dentro de cada familia de perlas de un subconjunto están cada una acopladas a una sonda de captura de ácido nucleico opcionalmente marcada que se puede unir a una región específica de cepa de VPH de un genoma de VPH u, opcionalmente, a al menos una de una secuencia de ácido nucleico de control, siempre que cualquier sonda de captura de ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico de control esté marcada con la misma marca que otras sondas de captura marcadas o secuencia de ácido nucleico en el subconjunto de perlas, y que dentro de cualquier subconjunto de perlas individual, cada familia de perlas del mismo tiene una intensidad fluorescente diferente, en los que la sonda de captura de ácido nucleico se selecciona de SEQ ID NOS:46-63; y

en los que la región específica de cepa del VPH de un genoma del VPH es un amplicón generado amplificando ácido nucleico a partir de una muestra biológica que se ha obtenido de un sujeto humano, que comprende putativamente VPH, en los que el amplicón es distinto para dicho VPH o una cepa particular de dicho VPH, y en los que el amplicón se genera usando un par de cebadores de amplificación de oligonucleótidos de un cebador directo y un cebador inverso, en los que el cebador directo del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:1-8, y el cebador inverso del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:9-12, y en los que al menos uno de los cebadores directos e inversos está conjugado a una protuberancia en el extremo 5' terminal del cebador; y

en los que cada familia de perlas es específica para la detección de una cepa de VPH diferente de cualquier otra familia de perlas en el conjunto de perlas; en los que dicho conjunto de perlas puede identificar una o más cepas de VPH específicas por medio de análisis del tamaño de perla, intensidad fluorescente, o discriminación de secuencias de la al menos una familia de perlas o subconjunto de perlas, usando citometría de flujo.

2. El conjunto de perlas de la reivindicación 1, en el que la protuberancia del cebador directo se selecciona del grupo que consiste en:

CAATCAGC, ACAAT, GGAACAAT, GGAAC, CAGCTT, ATTACC, CTGTT, /5Phos/CAATCAGC, /5Phos/ACAAT, /5Phos/GGAACAAT, /5Phos/GGAAC, /5Phos/CAGCTT, 5Phos/ATTACC, y /5Phos/CTGTT.

3. El conjunto de perlas de la reivindicación 1, en el que los tamaños de perla se seleccionan del grupo que consiste en: 3,0 μm , 3,5 μm , 3,77 μm , 5,0 μm , 5,6 μm y 6,8 μm .

4. El conjunto de perlas de una de las reivindicaciones 1-3 en el que las perlas marcadas se marcan con un fluorocromo seleccionado del grupo que consiste en: hidroxycumarina, aminocumarina, metoxicumarina, azul Cascade, amarillo Lucifer, NBD, ficoeritrina (PE), PerCP, alofocianina, Hoechst 33342, DAPI, azul SYTOX, Hoechst 33258, cromomicina A3, mitramicina, YOYO-1, verde SYTOX, naranja SYTOX, 7-AAD, naranja de acridina, TOTO-1, To-PRO-1, naranja de tiazol, TOTO-3, TO-PRO-3, LDS 751, Alexa Fluro-350, Alexa Fluro-430, Alexa Fluro-488, Alexa Fluro-532, Alexa Fluro-546, Alexa Fluro-555, Alexa Fluro-556, Alexa Fluro-594, Alexa Fluro-633, Alexa Fluro-647, Alexa Fluro-660, Alexa Fluro-680, Alexa Fluro-700 y Alexa Fluro-750, BoDipy 630/650 y BoDipy 650/665, los colorantes CY Cy2, Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy-5,5 y Cy7, 6-FAM (fluoresceína), PE-Cy5, PE-Cy7, fluoresceína dT, Hexaclorofluoresceína (Hex), 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE), colorantes Oregon Green 488-X y 514, colorantes rodamina X-rodamina, lisamina rodamina B, verde rodamina, rojo rodamina, y ROX, TRITC, tetrametilrodamina (TMR), carboxitetrametilrodamina (TAMRA), tetraclorofluoresceína (TET), Rojo 6E, FluorX, BODIPY-FL, colorante SYBR Green I, y rojo Texas.

5. El conjunto de perlas de la reivindicación 4 en el que las perlas marcadas se marcan con TMR.

6. El conjunto de perlas de la reivindicación 1 que comprende de 2 a 17 familias de perlas.

7. El conjunto de perlas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el conjunto de perlas comprende 17 familias de perlas.

8. El conjunto de perlas de la reivindicación 1, en el que las dos o más cepas de VPH se seleccionan de las cepas 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68.

9. Un método para preparar un conjunto de perlas para su uso en la detección de una cepa de VPH y/o diferenciación entre dos o más cepas de VPH, comprendiendo el método seleccionar una pluralidad de familias o subconjuntos de perlas en base al tamaño, intensidad fluorescente, o ambos, que comprende proporcionar:

(a) al menos dos subconjuntos de perlas, en los que cada subconjunto de perlas se puede distinguir fisicoquímicamente de cualquier otro subconjunto de perlas en base, al menos, al tamaño, o

(b) al menos un subconjunto de perlas que tienen al menos dos familias, en el que las perlas en un subconjunto de perlas son homogéneas en tamaño unas con respecto a otras, y se pueden distinguir fisicoquímicamente en dos o más familias de perlas en base al nivel de marcado que contiene cada una, o

(c) una combinación de dichas familias de perlas y dichos subconjuntos de perlas;

y en los que:

las perlas dentro de cada familia de perlas de un subconjunto están cada una acopladas a una sonda de captura de ácido nucleico opcionalmente marcada que se puede unir a una región específica de cepa de VPH de un genoma de VPH u, opcionalmente, a al menos una de una secuencia de ácido nucleico de control, siempre que cualquier sonda de captura de ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico de control esté marcada con la misma marca que otras sondas de captura marcadas o secuencia de ácido nucleico en el subconjunto de perlas, y que dentro de cualquier subconjunto de perlas individual, cada familia de perlas del mismo tiene una intensidad fluorescente diferente, en los que la sonda de captura de ácido nucleico se selecciona de SEQ ID NOs:46-63; y

en los que la región específica de cepa del VPH de un genoma del VPH es un amplicón generado amplificando ácido nucleico a partir de una muestra biológica que se ha obtenido de un sujeto humano, que comprende putativamente VPH, en los que el amplicón es distinto para dicho VPH o una cepa particular de dicho VPH, y en los que el amplicón se genera usando un par de cebadores de amplificación de oligonucleótidos de un cebador directo y un cebador inverso, en los que el cebador directo del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:1-8, y el cebador inverso del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:9-12, y en los que al menos uno de los cebadores directos e inversos está conjugado a una protuberancia en el extremo 5' terminal del cebador; y

en los que cada familia de perlas es específica para la detección de una cepa de VPH diferente de cualquier otra familia de perlas en el conjunto de perlas; y

mezclar las al menos dos familias o al menos dos subconjuntos de perlas juntas para producir un conjunto de perlas que permita la identificación de una cepa específica de VPH por medio del análisis del tamaño de perla, intensidad fluorescente, o discriminación de secuencias de la al menos una familia de perlas o subconjunto de perlas, usando citometría de flujo.

10. El método de la reivindicación 9, en el que la protuberancia del cebador directo se selecciona del grupo que consiste en:

CAATCAGC, ACAAT, GGAACAAT, GGAAC, CAGCTT, ATTACC, CTGTT, /5Phos/CAATCAGC, /5Phos/ACAAT, /5Phos/GGAACAAT, /5Phos/GGAAC, /5Phos/CAGCTT, 5Phos/ATTACC, y /5Phos/CTGTT.

11. Un método in vitro para detectar y/o diferenciar entre una o más particular cepas de VPH en una muestra biológica, comprendiendo dicho método:

(i) aislar el ácido nucleico de una muestra biológica se había obtenido a partir de un sujeto humano, que comprende putativamente VPH,

(ii) amplificar el ácido nucleico de dicha muestra usando cebadores que generan un amplicón que es distinto para dicho analito o una cepa particular de dicho analito,

(iii) amplificar opcionalmente una secuencia de ácido nucleico de control del ADN genómico del sujeto humano,

(iv) efectuar opcionalmente el marcado del/de los amplicón/amplicones enumerados en las etapas (ii) y/o (iii),

(v) hibridar el/los amplicón/amplicones marcados a un conjunto de perlas de reactivos en los que cada miembro del conjunto de perlas comprende una molécula de ácido nucleico que tiene complementariedad con una secuencia de nucleótidos del VPH o una cepa de VPH particular o una secuencia de nucleótidos de control, unida o asociada de otro modo con un sustrato que se puede distinguir fisicoquímicamente, en el que la hibridación se produce en presencia de al menos una secuencia de oligonucleótidos de bloqueo, y

(vi) determinar a qué reactivo se ha unido un amplicón;

en el que la asociación de un amplicón con un reactivo particular es indicativa de una infección por VPH en el sujeto humano;

en el que los cebadores incluyen un cebador directo y un cebador inverso, en el que el cebador directo del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:1-8, y el cebador inverso del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:9-12, y en el que al menos uno de los cebadores directos e inversos está conjugado a una protuberancia en el extremo 5' terminal del cebador.

12. El método de la reivindicación 11, en el que la protuberancia del cebador directo se selecciona del grupo que consiste en:

CAATCAGC, ACAAT, GGAACAAT, GGAAC, CAGCTT, ATTACC, CTGTT, /5Phos/CAATCAGC, /5Phos/ACAAT, /5Phos/GGAACAAT, /5Phos/GGAAC, /5Phos/CAGCTT, 5Phos/ATTACC, y /5Phos/CTGTT.

13. Un método in vitro para detectar y/o diferenciar entre una o más particular cepas de VPH en una muestra biológica, comprendiendo dicho método:

(i) aislar el ácido nucleico de una muestra biológica se había obtenido a partir de un sujeto humano, que comprende putativamente VPH,

(ii) amplificar el ácido nucleico de dicha muestra usando cebadores que generan un amplicón que es distinto para dicho analito o una cepa particular de dicho analito,

(iii) amplificar opcionalmente una secuencia de ácido nucleico de control del ADN genómico del sujeto humano,

(iv) hibridar el/los amplicón/amplicones marcados a un conjunto de perlas de reactivos en los que cada miembro del conjunto de perlas comprende una molécula de ácido nucleico que tiene complementariedad con una secuencia de nucleótidos de VPH o una cepa de VPH particular o una secuencia de nucleótidos de control, unida o asociada de otro modo con un sustrato que se puede distinguir fisicoquímicamente y en el que la hibridación se produce en presencia de al menos una secuencia de oligonucleótidos de señal y en presencia de al menos una secuencia de oligonucleótidos de bloqueo, y

(v) determinar a qué reactivo se ha unido un amplicón;

en el que la asociación de un amplicón con un reactivo particular es indicativa de una infección por VPH en el sujeto humano;

en el que los cebadores incluyen un cebador directo y un cebador inverso, en el que el cebador directo del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:1-8, y el cebador inverso del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:9-12, y en el que al menos uno de los cebadores directos e inversos está conjugado a una protuberancia en el extremo 5' terminal del cebador.

14. El método de la reivindicación 13, en el que la protuberancia del cebador directo se selecciona del grupo que consiste en:

CAATCAGC, ACAAT, GGAACAAT, GGAAC, CAGCTT, ATTACC, CTGTT, /5Phos/CAATCAGC, /5Phos/ACAAT, /5Phos/GGAACAAT, /5Phos/GGAAC, /5Phos/CAGCTT, 5Phos/ATTACC, y /5Phos/CTGTT.

15. Un método para determinar el riesgo de que un sujeto humano desarrolle una enfermedad asociada con una o más cepas de VPH comprendiendo dicho método las etapas del método de la reivindicación 11 o 13, en el que la asociación de un amplicón con un reactivo particular que comprende un polinucleótido que es complementario a una cepa de VPH asociada con una enfermedad particular, es indicativa de un incremento en el riesgo de dicha enfermedad en el sujeto.

16. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que el conjunto de perlas de reactivos comprende una pluralidad de familias o una pluralidad de subconjuntos de perlas que tienen:

(a) al menos dos subconjuntos de perlas, en los que cada subconjunto de perlas se puede distinguir fisicoquímicamente de cualquier otro subconjunto de perlas en base, al menos, al tamaño, o

5 (b) al menos un subconjunto de perlas que tienen al menos dos familias, en el que las perlas en un subconjunto de perlas son homogéneas en tamaño unas con respecto a otras, y se pueden distinguir fisicoquímicamente en dos o más familias de perlas en base al nivel de marcado que contiene cada una, o

(c) una combinación de dichas familias de perlas y dichos subconjuntos de perlas;

10 y en los que:

las perlas dentro de cada familia de perlas de un subconjunto están cada una acopladas a una sonda de captura de ácido nucleico opcionalmente marcada que se puede unir a una región específica de cepa de VPH de un genoma de VPH u, opcionalmente, a al menos una de una secuencia de ácido nucleico de control, siempre que cualquier sonda
15 de captura de ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico de control esté marcada con la misma marca que otras sondas de captura marcadas o secuencia de ácido nucleico en el subconjunto de perlas, y que dentro de cualquier subconjunto de perlas individual, cada familia de perlas del mismo tiene una intensidad fluorescente diferente; y

20 cada familia de perlas es específica para la detección de una cepa de VPH diferente de cualquier otra familia de perlas en el conjunto de perlas; en los que dicho conjunto de perlas puede identificar una o más cepas de VPH específicas por medio de análisis del tamaño de perla, intensidad fluorescente, o discriminación de secuencias de la al menos una familia de perlas o subconjunto de perlas, usando citometría de flujo.

25 17. Un par de cebadores de amplificación de oligonucleótidos para dirigir VPH oncogénico, en el que el cebador directo del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:1-8, y el cebador inverso del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:9-12, y en el que al menos uno de los cebadores directos e inversos está conjugado con una protuberancia en el extremo 5' terminal del cebador.

30 18. Un par de cebadores de la reivindicación 17, en el que la protuberancia del cebador directo se selecciona del grupo que consiste en:

CAATCAGC, ACAAT, GGAACAAT, GGAAC, CAGCTT, ATTACC, CTGTT, /5Phos/CAATCAGC, /5Phos/ACAAT, /5Phos/GGAACAAT, /5Phos/GGAAC, /5Phos/CAGCTT, 5Phos/ATTACC, y /5Phos/CTGTT.

35 19. Un par de cebadores de la reivindicación 17, en el que la protuberancia del cebador inverso se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:87-94.

40 20. Un par de cebadores de la reivindicación 17, que contienen una secuencia de protuberancia de ácido nucleico opcional, en el que el cebador directo del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en:

CAR YTR TTT GTT ACT GTK GTD GA (SEQ ID NO:3), que tiene opcionalmente una ACAAT (SEQ ID NO:110), /5Phos/ACAAT (SEQ ID NO:35), GGAACAAT (SEQ ID NO:111), o una /5Phos/GGAACAAT (SEQ ID NO:36) conjugada al extremo 5' terminal del cebador; y

45 GTD GAT ACY AC HCG YAG TAC HAA (SEQ ID NO:8), que tiene opcionalmente una CTGTT (SEQ ID NO:112) o /5Phos/CTGTT (SEQ ID NO:41) conjugada con el extremo 5' terminal del cebador.

50 21. Un par de cebadores de la reivindicación 17, que contienen una secuencia de protuberancia de ácido nucleico opcional, en el que el cebador inverso del par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en:

TGA AAA ATA AAY TGY AAA TCA TAT TCY TCM MCA TG (SEQ ID NO:9) que tiene opcionalmente una ACTCACTATAGG (SEQ ID NO:113) o /5AmMC6/ACTCACTATAGG (SEQ ID NO:42) conjugada al extremo 5' terminal del cebador,

55 TR CAY ARY TGA AAA ATA AAY TG (SEQ ID NO:11), que tiene opcionalmente una TCTAATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO:114) o /5AmMC6/TCTAATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO:44) conjugada al extremo 5' terminal del cebador.

FIGURA 1

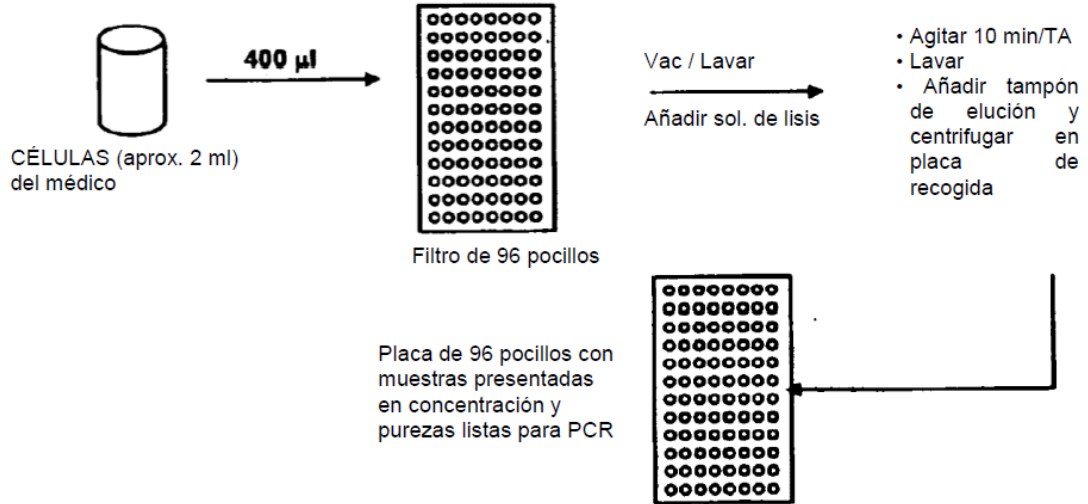
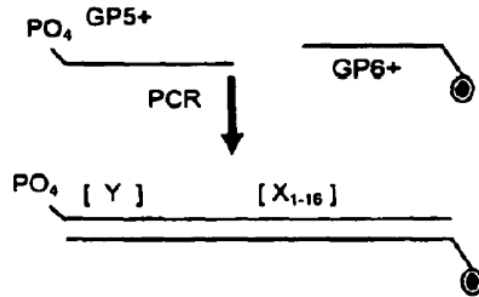
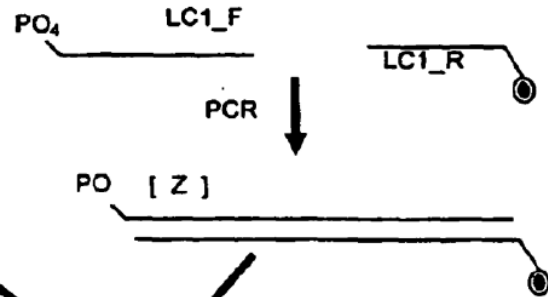


FIGURA 2

PCR vírico (General: amplifica virtualmente todas las cepas conocidas)



PCR genómico humano (control interno para amplificación con éxito)



Y = secuencia para todas las VPH
X = secuencia específica de cepa de VPH
Z = secuencia específica para control humano

Hibridar productos de PCR a perlas con complementos para Y, X y Z.

FIGURA 3

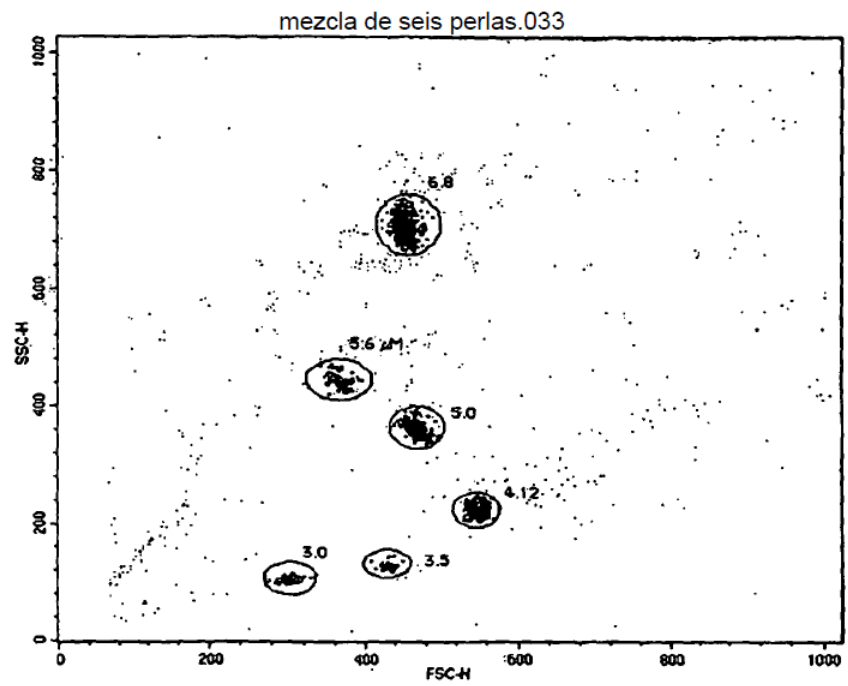


FIGURA 4

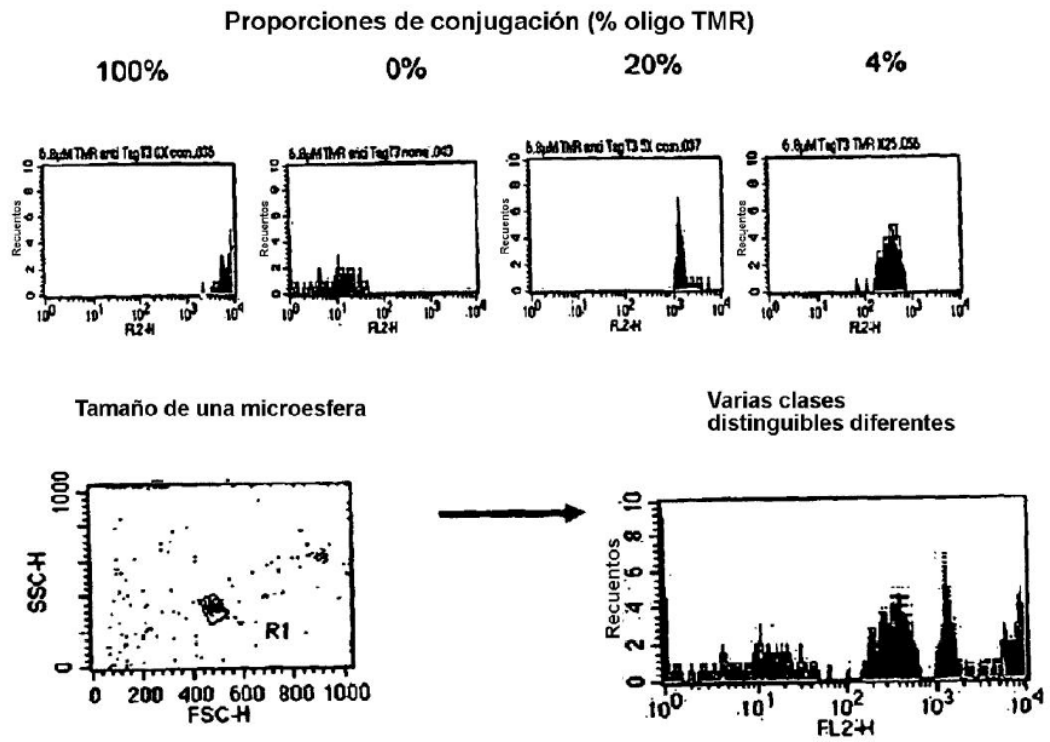


FIGURA 5

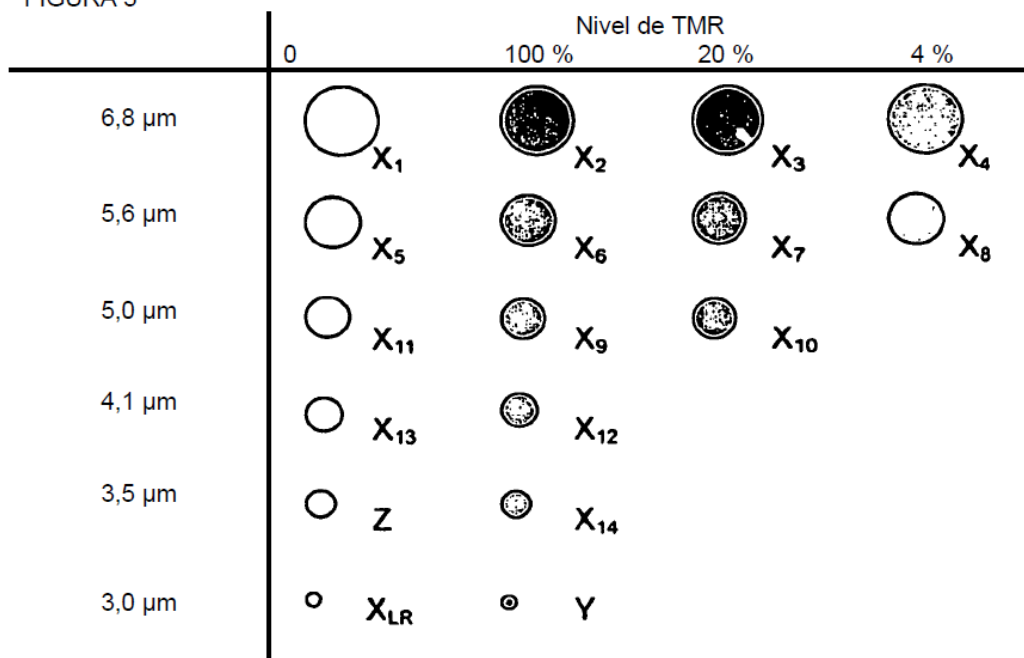


FIGURA 6

Cepa	Tamaño de perla	Proporción de TMR
6	3,0 µm	TMR alto
11	3,0 µm	Sin TMR
16	5,0 µm	TMR medio
18	5,0 µm	TMR alto
31	4,1 µm	Sin TMR
33	5,0 µm	Sin TMR
35	5,6 µm	Sin TMR
39	3,5 µm	TMR medio
45	3,5 µm	TMR alto
51	4,1 µm	TMR medio
52	6,8 µm	TMR medio
56	4,1 µm	TMR alto
58	6,8 µm	TMR alto
59	5,6 µm	TMR alto
66	5,6 µm	TMR medio
68	6,8 µm	Sin TMR
Control de MLC1	5,6 µm	Sin TMR

FIGURA 7

	Nível de TMR			
	0	100 %	20 %	4 %
6,8 μm	 X_1	 X_2	 X_3	 X_4
5,6 μm	 X_5	 X_6	 X_7	 X_8
5,0 μm	 X_{11}	 X_9	 X_{10}	
4,1 μm	 X_{13}	 X_{12}		
3,5 μm	 Z	 X_{14}		
3,0 μm	 X_{LR}	 Y		