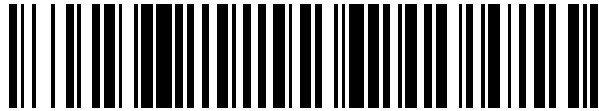


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 583**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2005 E 10161839 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 2251441**

54 Título: **Detección de parvovirus B19**

30 Prioridad:

10.02.2004 EP 04002854

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

12.09.2013

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

SCHORLING, STEFAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 422 583 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

Detección de parvovirus B19

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos cebadores y sondas para la detección del parvovirus B19, así como a kits que contienen los mismos. Además, la invención se refiere a métodos en los que pueden utilizarse los nuevos cebadores y sondas, en particular métodos homogéneos de reacción en cadena de la polimerasa. Además, la invención se refiere a usos de los nuevos cebadores y sondas.

Antecedentes de la invención

La infección por el parvovirus B19 es una enfermedad infantil común que habitualmente presenta un cuadro leve en individuos inmunocompetentes, produciendo una erupción característica conocida como eritema infeccioso o quinta enfermedad (Anderson M.J. *et al.*, Lancet 1:1378, 1983). La infección puede complicarse con artralgia severa o con una crisis aplásica transitoria en individuos que sufren de enfermedad hemolítica crónica (J.R. *et al.*, Lancet 1:664-665, 1981). También se ha descrito anemia congénita y vasculitis (Cohen B., BMJ 311:1549-1552, 1995). Más recientemente, el virus se ha asociado a hepatitis y miocarditis (Yoto Y. *et al.*, Lancet 347:868-9, 1996; Enders G. *et al.*, Clin. Infect. Dis. 26:355-358, 1998; Dux S. *et al.*, Dtsch Med. Wochenschr. 127:1584-1588, 2002). Con la infección materna durante el embarazo, el virus puede transmitirse al feto, provocando hidropesía, aborto espontáneo o muerte intrauterina (Enders E., Infections of the fetus and the neonate other than rubella. Microbiology and Microbial Infections, de Topley y Wilson, editado por Collier L., London, Edward Arnold, 1998, páginas 873 a 915). Aparte de la transmisión por la vía respiratoria, la infección por parvovirus B19 también puede producirse por sangre y productos sanguíneos contaminados (Brown K.E., Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol. 13:245-259, 2000). Esto último ha sido reconocido por la Food and Drug Administration estadounidense, dando lugar a una propuesta para que se considere la realización de análisis de ácidos nucleicos (AAN) de parvovirus B19 como ensayo realizado durante el procedimiento y no como cribado del donante.

En el campo del diagnóstico molecular, la detección de ácidos nucleicos diana utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desempeña un papel importante. El cribado rutinario de bancos de sangre para la presencia de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o virus de la hepatitis B (VHB) o virus de la hepatitis C (VHC) es un ejemplo de la aplicación a gran escala del diagnóstico basado en la PCR. Los sistemas automatizados para el análisis basado en la PCR con frecuencia utilizan la detección en tiempo real de la amplificación de productos durante el procedimiento de la PCR. Resulta crucial en dichos métodos la utilización de oligonucleótidos modificados portadores de grupos informadores o de marcajes. La detección de los productos de amplificación del ADN generados mediante un procedimiento de PCR puede llevarse a cabo, por una parte, en etapas de trabajo separadas. Éstas podrían implicar la caracterización de los fragmentos amplificados con respecto a su movilidad electroforética y/o el análisis de los productos de amplificación desnaturalizados unidos a un soporte sólido utilizando una sonda de hibridación.

Por otra parte, la detección de los productos de amplificación del ADN puede llevarse a cabo en un sistema de ensayo denominado "homogéneo". Un sistema de ensayo "homogéneo" comprende moléculas informadoras o marcajes que generan una señal mientras se amplifica la secuencia diana. Un ejemplo de un sistema de ensayo "homogéneo" es el sistema TaqMan[®] que se detalla en las patentes US n° 5.210.015, n° 5.804.375 y n° 5.487.972. Brevemente, el método se basa en una sonda doblemente marcada y en la actividad de exonucleasa 5'-3' de la ADN polimerasa Taq. La sonda es complementaria a la secuencia diana que debe amplificarse mediante el procedimiento de PCR y se sitúa entre los dos cebadores de PCR durante cada etapa del ciclo de polimerización. La sonda presenta dos marcajes fluorescentes unidos a la misma. Uno es un pigmento informador, tal como 6-carboxifluoresceína (FAM), que presenta su espectro de emisión desactivado por transferencia de energía debido a la proximidad espacial de un segundo pigmento fluorescente, la 6-carboxi-tetrametil-rodamina (TAMRA). Durante el curso de cada ciclo de amplificación, la ADN polimerasa Taq en el proceso de alargamiento de una cadena de ADN con cebador desplaza y degrada la sonda hibridada, debido a la actividad intrínseca de exonucleasa 5'-3' de la polimerasa. El mecanismo también libera el pigmento informador respecto de la actividad desactivadora de TAMRA. En consecuencia, se incrementa la actividad fluorescente al incrementarse el corte de la sonda, lo que es proporcional a la cantidad de producto de PCR formado. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la secuencia diana amplificada se mide mediante la detección de la intensidad del marcaje de fluorescencia liberado. Otro ejemplo de sistemas de ensayo "homogéneos" lo proporcionan los formatos utilizados en el instrumento LightCycler[®] (ver, por ejemplo, la patente US n° 6.174.670), algunos de los cuales en ocasiones se denominan formatos de ("sonda besadora"). Nuevamente, el principio se basa en dos pigmentos interactuantes que, sin embargo, se caracterizan porque la longitud de onda de emisión de un pigmento donante excita un pigmento aceptor mediante transferencia de energía de resonancia fluorescente. El instrumento AmpliPrep COBAS[®] (Roche Diagnostics GmbH, D-68305 Mannheim, Alemania) se ha comercializado recientemente para expandir la automatización mediante

aislamiento de secuencias diana utilizando sondas de captura específicas de secuencia biotiniladas conjuntamente con partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Jungkind D., J. Clin. Virol. 20:1-6, 2001; Stelzl E. *et al.*, J. Clin. Microbiol. 40:1447-1450, 2002). Recientemente se le ha unido una herramienta versátil adicional, el kit de aislamiento de ácidos nucleicos totales (TNAI) (Roche Diagnostics). Este reactivo de uso en laboratorio permite el aislamiento genérico, no específico de secuencia, de todos los ácidos nucleicos del plasma y del suero en el instrumento COBAS® AmpliPrep basándose esencialmente en el método desarrollado por Boom R. *et al.*, J. Clin. Microbiol. 28:495-503, 1990.

Los sistemas de ensayo para el parvovirus B19 se dan a conocer en la publicación de patente japonesa no examinada nº 147986/1995 ó en Schorling S. *et al.*, J. Mol. Diagn. 6:37-41, 2004. Los cebadores para la detección del parvovirus B19 de la región VP1 ó VP2 se dan a conocer en la patente US nº 6.274.307. La clonación de VP1 y VP2 se da a conocer en la patente JP nº 04088985. Se da a conocer una sonda para el parvovirus RA-1 en la patente EP nº 238 893, y sondas para el parvovirus B19 en el documento WO nº 01/06019. El gen NS1 y las sondas del mismo se dan a conocer en la patente EP nº 783 580. La detección basada en la PCR del parvovirus B19 se describe en la patente RU nº 2146372. Una secuencia de ácidos nucleicos de un eritrovirus específico se describe en el documento WO nº 99/28439. El documento WO nº 03/002753 describe un ensayo diagnóstico para el parvovirus B19. El documento WO nº 02/00924 describe la fosfolipasa A2 parvovírica. Un método para determinar grandes cantidades de parvovirus B19 se describe en la patente US nº 6.183.999. El ensayo para el parvovirus B19 se da a conocer en el documento WO nº 01/14593. Los constructos de control de ADN se dan a conocer en el documento WO nº 02/096925. Las partículas de tipo parvovírico se describen en el documento WO nº 91/04330. La patente JP nº 11221099 describe la amplificación por PCR del parvovirus B19. Un método de tratamiento de las infecciones por parvovirus B19 se da a conocer en la patente US nº 6.268.349. Los vehículos de administración génica de parvovirus B19 autónomos se describen en la patente US nº 5.585.254 y en las patentes US correspondientes y en el documento WO nº 00/24917.

La secuencia del parvovirus B19 se describe en Shade R.O. *et al.*, J. Virol. 58:921-936, 1986, y el análisis del genoma se describe en Cotmore S.F. *et al.*, J. Virol. 60:548-557, 1986, y en Ozawa K. *et al.*, J. Virol. 62:2508-2511, 1988. Un método de detección del parvovirus B19 se describe en Sato K. *et al.*, J. Clin. Microbiol. 38:1241-1243, 2000; Cubie H.A. *et al.*, Mol. Cell Probes 9:59-66, 1995; Jordan J.A. *et al.*, Mol. Diagn. 1:321-328, 1996; Vassias I. *et al.*, J. Virol. Meth. 44:329-338, 1993, y en Carriere C. *et al.*, J. Virol. Methods 44:221-234, 1993, y en Holloway B. *et al.*, Nucleic Acids Res. 21:3905-3906, 1993. La región VP1 ha sido analizada por Dorsch S. *et al.*, J. Gen. Virol. 82:191-199, 2001, y Takahashi N. *et al.*, FEBS Lett. 450:289-293, 1999. La región NS1 es analizada por Hicks K.E. *et al.*, Arch. Virol. 141:1319-1327, 1996. La variabilidad de secuencias entre diferentes aislados de parvovirus B19 se describe en Hemauer A. *et al.*, J. Gen. Virol. 77:1781-1785, 1996; Umene K. y Nunoue T., J. Gen. Virol. 76:2645-2651, 1995, Erdman D.D. *et al.*, J. Gen. Virol. 77:2767-2774, 1996, y Astell *et al.*, J. Gen. Virol. 68:885-893, 1987, y Turton J. *et al.*, Epidemiol. Infect. 105:197-201, 1990.

El documento WO nº 99/28439 describe determinados cebadores y sondas adecuados para la detección del eritrovirus V9 y B19. La patente US nº 6.395.472 da a conocer cebadores o sondas oligómeros de ácidos nucleicos que resultan útiles para la detección de virus TT. Schmidt *et al.* (Vox Sanguinis 81:228-235, 2001) dan a conocer la detección de parvovirus B19 en bancos de plasma y derivados de plasma.

Descripción resumida de la invención

Debido a la significación clínica del parvovirus B19, existe una necesidad de cebadores y sondas adicionales que puedan detectar el virus en muestras biológicas.

Por lo tanto, la invención proporciona un método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra, comprendiendo las etapas de:

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana,
- (b) proporcionar una pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebador, en la que el primer cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 14, y en la que el segundo cebador consiste de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 16,
- (c) amplificar el ácido nucleico diana, (d) detectar el ácido nucleico diana amplificado de la etapa (c).

La invención proporciona además un método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra, comprendiendo las etapas de:

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana,
- (b) proporcionar una pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebador,
- (c) amplificar el ácido nucleico diana,
- (d) poner en contacto la muestra con una sonda bajo condiciones de unión de la sonda al ácido nucleico diana,
- (e) detectar el producto de unión entre el ácido nucleico diana y la sonda a modo de indicación de la presencia del ácido nucleico diana, caracterizado porque el primer cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos

SEC ID nº 14, y en el que el segundo cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 16, y la sonda consiste de por lo menos 12 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 5 ó una secuencia complementaria de la misma.

5 Además, se da a conocer en la presente memoria un oligonucleótido en el que la secuencia de ácidos nucleicos del oligonucleótido se selecciona de entre las secuencias de ácidos nucleicos SEC ID nº 12 a nº 15, de entre las secuencias de ácidos nucleicos nº 10 ó nº 11, o secuencia complementaria de las mismas, o de entre las secuencias complementarias de las secuencias de ácidos nucleicos nº 16 ó nº 17.

10 En otra realización de la invención, se proporciona una pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebador, en la que la secuencia de ácidos nucleicos del primer cebador es SEC ID nº 14, y en la que la secuencia de ácidos nucleicos del segundo cebador es SEC ID nº 16.

15 Los oligonucleótidos o la pareja de cebadores según la invención pueden utilizarse en una reacción de hibridación con un ácido nucleico complementario. En otra realización de la invención, los oligonucleótidos o la pareja de cebadores según la invención pueden utilizarse como cebador, sonda o sonda de captura.

La invención proporciona además un kit que comprende una ADN polimerasa dependiente de molde, nucleótidos y una pareja de cebadores según la invención.

20 Descripción detallada de la invención

Las técnicas convencionales de biología molecular y química de los ácidos nucleicos, los cuales se encuentran comprendidos en los conocimientos del experto en la materia, se explican en la literatura. Ver, por ejemplo, Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, Gait M.J., editor, 1984; Nucleic Acid Hybridization, Hames, B.D. y Higgins, S.J., editores, 1984; y una serie, Methods in Enzymology, Academic Press, Inc.

30 Antes de que los ácidos nucleicos de la muestra puedan analizarse en uno de los ensayos anteriormente indicados, deben aislarse o purificarse a partir de las muestras biológicas que contienen mezclas complejas de diferentes componentes. Con frecuencia, para las primeras etapas, se utilizan procedimientos que permiten el enriquecimiento de los ácidos nucleicos. Para liberar el contenido de las células o de las partículas víricas, pueden tratarse con enzimas o con compuestos químicos para disolver, degradar o desnaturalizar las paredes celulares o las partículas víricas. Este procedimiento se denomina comúnmente lisis. La solución resultante que contiene dicho material lisado se denomina lisado. Un problema observado con frecuencia durante la lisis es que otros enzimas degradantes del componente de interés, por ejemplo las desoxirribonucleasas o las ribonucleasas que degradan los ácidos nucleicos, entran en contacto con el componente de interés durante la lisis. Estos enzimas degradativos también pueden encontrarse presente en el exterior de las células o pueden haber sido separados espacialmente en diferentes compartimientos celulares antes de la lisis y de esta manera entrar en contacto ahora con el componente de interés. Otros componentes liberados durante este procedimiento pueden ser, por ejemplo, endotoxinas pertenecientes a la familia de los lipopolisacáridos, que son tóxicos para las células y pueden provocar problemas para los productos destinados a la utilización en terapia humana o animal.

45 Existe una diversidad de medios para tratar este problema, mencionado anteriormente. Es común utilizar agentes caotrópicos tales como, por ejemplo, tiocianato de guanidinio o detergentes aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos o no iónicos en el caso de que se pretenda liberar los ácidos nucleicos. También es una ventaja utilizar proteasas que degradan rápidamente estas enzimas o proteínas no deseadas. Sin embargo, esto puede producir otro problema, ya que dichas sustancias o enzimas pueden interferir con reactivos o componentes en etapas posteriores.

50 Los enzimas que pueden utilizarse ventajosamente en dichos procedimientos de lisis o de preparación de muestras mencionados anteriormente son enzimas que cortan los enlaces amida en los sustratos proteína y que se clasifican como proteasas o (intercambiablemente) como peptidasas (ver Walsh, Enzymatic Reaction Mechanisms, W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1979, capítulo 3). Las proteasas que han sido utilizadas en la técnica anterior son, por ejemplo, las proteasa alcalinas (documento WO nº 98/04730) o las proteasas ácidas (patente US nº 5.386.024). La ptoeasa que se ha utilizado ampliamente en la técnica anterior para la preparación de muestras para el aislamiento de ácidos nucleicos es la proteinasa K de *Tritirachium album* (ver, por ejemplo, Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989), el cual se encuentra activo a un pH aproximadamente neutro y pertenece a una familia de proteasas conocida por el experto en la materia como subtilisinas.

60 En las siguientes etapas de la preparación de muestras que siguen a la etapa de lisis, el componente de interés puede enriquecerse adicionalmente. En el caso de que los componentes de interés no proteicos sean, por ejemplo, ácidos nucleicos, se extraen normalmente de las mezclas complejas de lisis antes de utilizarse en un ensayo basado

en sondas.

Existen varios métodos para la extracción de ácidos nucleicos:

- métodos dependientes de la secuencia o bioespecíficos, tales como, por ejemplo:

- la cromatografía de afinidad
- la hibridación con sondas inmovilizadas

- métodos independientes de la secuencia o físicoquímicos, tales como, por ejemplo:

- la extracción líquido-líquido con, por ejemplo, fenol-cloroformo,
- la precipitación con, por ejemplo, etanol puro,
- la extracción con papel de filtro,
- la extracción con agentes formadores de micelas, tales como bromuro de cetiltrimetilamonio,
- la unión a pigmentos intercalantes inmovilizados, por ejemplo derivados de acridina,
- la adsorción a gel de sílice o a tierras diatomáceas,
- la adsorción a partículas magnéticas de vidrio (PMV) o a partículas de organosilano, bajo condiciones caotrópicas.

Resulta particularmente interesante para los fines de extracción, la adsorción de los ácidos nucleicos a una superficie de vidrio, aunque resultan posibles otras superficies. En los últimos años se han propuesto muchos procedimientos para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de su ambiente natural, a partir de la utilización de su comportamiento de unión a las superficies de vidrio. En el caso de que los ácidos nucleicos no modificados sean la diana, resulta preferente una unión directa de los ácidos nucleicos a un material con una superficie de sílice debido a que no resulta necesario modificar los ácidos nucleicos e incluso pueden unirse a ácidos nucleicos nativos. Estos procedimientos se han descrito en detalle en diversos documentos. En Vogelstein B. *et al.*, Proc. Natl. Acad. USA 76:615-9, 1979, por ejemplo, se propone un procedimiento para la unión de ácidos nucleicos de geles de agarosa en presencia de yoduro sódico a vidrio blanco molido. La purificación de ADN plasmídico a partir de bacterias sobre polvo de vidrio en presencia de perclorato sódico se describe en Marko M.A. *et al.*, Anal. Biochem. 121:382-387, 1982. En el documento DE nº A 37 34 442, se describe el aislamiento del fago de ADN de cadena sencilla M13 sobre filtros de fibra de vidrio mediante la precipitación de las partículas fágicas utilizando ácido acético y la lisis de las partículas fágicas con perclorato. Los ácidos nucleicos unidos a los filtros de fibra de vidrio se lavan y después se eluyen con un tampón Tris/EDTA que contiene metanol. Se describe un procedimiento similar para purificar ADN a partir de fagos lambda en Jakobi R. *et al.*, Anal. Biochem. 175:196-201, 1988. El procedimiento comprende la unión selectiva de ácidos nucleicos a superficies de vidrio en soluciones salinas caotrópicas y la separación de los ácidos nucleicos de contaminantes tales como agarosa, proteínas o residuos celulares. Para separar las partículas de vidrio de los contaminantes, las partículas pueden centrifugarse o aspirarse líquidos a través de filtros de fibra de vidrio. Ésta es, sin embargo, una etapa limitante que impide que el procedimiento sea utilizado para procesar grandes cantidades de muestras. La utilización de partículas magnéticas para inmovilizar los ácidos nucleicos tras la precipitación mediante adición de sal y etanol resulta más ventajosa y se describe, por ejemplo, en Alderton R.P. *et al.*, Anal. Biochem. 201:166-169, 1992, y en el documento nº PCT GB 91/00212. En este procedimiento, los ácidos nucleicos se aglutinan conjuntamente con las partículas magnéticas. Se separa el aglutinado del solvente original mediante la aplicación de un campo magnético y realizando una etapa de lavado. Tras una etapa de lavado, se disuelven los ácidos nucleicos en un tampón Tris. Sin embargo, este procedimiento presenta una desventaja en que la precipitación no es selectiva para los ácidos nucleicos. Antes bien, también se aglutina una diversidad de sustancias sólidas y disueltas. En consecuencia, este procedimiento no puede ser utilizado para eliminar cantidades significativas de cualesquiera inhibidores de reacciones enzimáticas específicas que podrían encontrarse presentes. También se encuentra disponible en el mercado vidrio poroso magnético que contiene partículas magnéticas en una matriz vítrea porosa particular y que se recubre con una capa que contiene estreptavidina. Este producto puede utilizarse para aislar materiales biológicos, por ejemplo proteínas o ácidos nucleicos, en el caso de que se modifiquen en una etapa preparativa compleja de manera que se unan covalentemente a la biotina. Los adsorbentes magnetizables particulares demostraron ser muy eficientes y adecuados para la preparación automática de muestras. Con este fin se utilizan pigmentos ferrimagnéticos y ferromagnéticos, así como superparamagnéticos. Las PVM y métodos más preferentes con partículas vítreas magnéticas son las descritas en el documento nº WO 01/37291.

Tras la purificación o aislamiento de los ácidos nucleicos, incluyendo el ácido nucleico diana, de su medio natural, puede detectarse el ácido nucleico diana. Por lo tanto, en una realización de la invención, se proporciona un método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra, comprendiendo las etapas de:

- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana,
- (b) proporcionar una pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebador, en la que el primer cebador consiste del ácido nucleico SEC ID nº 14, y en la que el segundo cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 16,
- (c) amplificar el ácido nucleico diana,

(d) detectar el ácido nucleico diana amplificado de la etapa (c).

Preferentemente, el método no comprende la etapa de proporcionar la muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana. Por lo tanto, en una realización de la invención, se proporciona un método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra, comprendiendo las etapas de:

(a) amplificar el ácido nucleico diana en una muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana y en presencia de una pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebador, en la que el primer cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 14, y en la que el segundo cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 16, y

(b) detectar el ácido nucleico diana amplificado de la etapa (a).

Tal como es conocido de la técnica, un "nucleósido" es una combinación de base-azúcar. La porción base del nucleósido normalmente es una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de dichas bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas.

Los "nucleótidos" son "nucleósidos" que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la porción azúcar del nucleósido. Para aquellos "nucleósidos" que incluyen un azúcar pentafuranosilo, el grupo fosfato puede unirse a la fracción 2', 3' ó 5'-hidroxilo del azúcar. Un "nucleótido" es la "unidad monomérica" de un "oligonucleótido", más generalmente denominada en la presente memoria "compuesto oligomérico", o es un "polinucleótido", más generalmente denominado "compuesto polimérico". Otra expresión general para el mismo es ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN).

Según la invención, un "compuesto oligomérico" es un compuesto que consiste de "unidades monoméricas" que pueden ser "nucleótidos" sólo o "compuestos no naturales" (ver posteriormente), más concretamente "nucleótidos modificados" (o "análogos de nucleótidos") o "compuestos no nucleótidos", solos o combinaciones de los mismos. Los "oligonucleótidos" y los "oligonucleótidos modificados" (o "análogos de oligonucleótidos") son subgrupos de "compuestos oligoméricos" en el contexto de la invención.

En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleótido" se refiere a "polinucleótidos" formados a partir de una pluralidad de "nucleótidos" como la "unidad monomérica", es decir, un "oligonucleótido" pertenece a un subgrupo específico de "compuestos oligoméricos" o de "compuestos poliméricos" de ácido ribonucleico (ARN) o de ácido desoxirribonucleico (ADN) con "unidades monoméricas". Se hace referencia comúnmente a los grupos fosfato como formadores del esqueleto internucleósido del "oligonucleótido". El enlace normal o esqueleto del ARN y del ADN es un enlace fosfodiéster 3' a 5'.

Pueden sintetizarse "oligonucleótidos" y "oligonucleótidos modificados" (ver posteriormente) según la invención tal como se describe de manera general en la técnica y es conocido por el experto en la materia. Los métodos para la preparación de compuestos oligoméricos de secuencias específicas son conocidos de la técnica, y entre ellos se incluyen, por ejemplo, la clonación y la restricción de secuencias apropiadas y la síntesis química directa. Entre los métodos de síntesis química pueden incluirse, por ejemplo, el método del fosfotriéster descrito por Narang S.A. *et al.*, *Methods in Enzymology* 68:90-98, 1979; el método del fosfodiéster dado a conocer por Brown E.L. *et al.*, *Methods in Enzymology* 68:109-151, 1979; el método de fosforamida dado a conocer en Beaucage *et al.*, *Tetrahedron Letters* 22:1859, 1981, el método del H-fosfonato dado a conocer en Garegg *et al.*, *Chem. Scr.* 25:280-282, 1985, y el método de soporte sólido dado a conocer en la patente US nº 4.458.066.

Tal como se ha indicado anteriormente, un "ácido nucleico", así como el "ácido nucleico diana", es un compuesto polimérico de "nucleótidos" tal como es conocido por el experto en la materia. Se utiliza en la presente memoria para referirse a un "ácido nucleico" en una muestra que debe analizarse, es decir, debe determinarse la presencia, la no presencia o la cantidad del mismo en una muestra. Por lo tanto, en otras palabras, el "ácido nucleico" es la diana y por lo tanto también puede denominarse "ácido nucleico diana". Por ejemplo, si debe determinarse si la sangre contiene parvovirus B19, el "ácido nucleico diana" es el ácido nucleico del parvovirus B19. La expresión "secuencia (de ácidos nucleicos) complementaria de una secuencia de ácidos nucleicos" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que la secuencia (de ácidos nucleicos) complementaria a la que se hace referencia es exactamente el complemento (inverso) de la secuencia de ácidos nucleicos.

El término "cebador" se utiliza en la presente memoria tal como es conocido por el experto en la materia y se refiere a "compuestos oligomérico", principalmente a "oligonucleótidos", aunque también a "oligonucleótidos modificados" que son capaces de "cebar" la síntesis de ADN por parte de una ADN polimerasa dependiente de molde, es decir, el extremo 3' de, por ejemplo, un oligonucleótido, proporciona un grupo 3'-OH libre al que una ADN polimerasa dependiente de molde puede unir "nucleótidos" adicionales estableciendo enlaces fosfodiéster 3' a 5', en el que se utilizan desoxinucleósidos trifosfato, liberando pirofosfato. Por lo tanto, no existe (excepto para la función deseada)

ninguna diferencia fundamental entre un "cebador", un "oligonucleótido" o una "sonda" según la invención. Tal como se utilizan en la presente memoria, las formas del singular "un", "una" y "el" y "la" incluyen las formas plurales, a menos que el contexto de uso indique claramente lo contrario.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "comprendiendo" situado antes de indicar las etapas en un método se refiere a que el método comprende una o más etapas que son adicionales a las expresamente indicadas, y que la etapa o etapas adicionales pueden llevarse a cabo antes, durante y/o después de las etapas indicadas. Por ejemplo, un método que comprende las etapas a, b y c comprende un método de etapas a, b, x y c, un método de etapas a, b, c y x, así como un método de etapas x, a, b y c. Además, el término "comprendiendo" situado antes de
10 indicar las etapas en un método no requiere (aunque podría requerir) la realización secuencial de las etapas indicadas, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, un método que comprende las etapas a, b y c comprende, por ejemplo, un método para llevar a cabo etapas en el orden de las etapas a, c y b, el orden de etapas c, b y a, y el orden de etapas c, a y b, etc.

15 La amplificación se lleva a cabo preferentemente con la reacción en cadena de la polimerasa, que amplifica específicamente ácidos nucleicos diana hasta cantidades detectables. Otras posibles reacciones de amplificación son la reacción en cadena de la ligasa (LCR; Wu D.Y. y Wallace R.B., *Genomics* 4:560-69, 1989, y Barany F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193, 1991; reacción en cadena de la polimerasa-ligasa (Barany F., *PCR Methods and Applic.* 1:5-16, 1991), Gap-LCR (documento WO n° 90/01069), la reacción de reparación de cadena (documento EP n° 0439182 A2), 3SR (Kwoh D.Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177, 1989; Guatelli J.C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878, 1990; documento WO n° 92/08808) y NASBA (patente US n° 5.130.238). Además, la amplificación por despalzamiento de cadena (SDA), la amplificación mediada por transcripción (TMA) y la amplificación Q β (para una revisión, ver, por ejemplo, Whelen A.C. y Persing D.H., *Annu. Rev. Microbiol.* 50:349-373, 1996; Abramson R.D. y Myers T.W., *Curr. Opin. Biotechnol.* 4:41-47, 1993).

25 Los métodos de detección de ADN adecuados son conocidos por el experto en la materia y se describen en libros de texto estándares, tales como Sambrook J. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, y Ausubel F. *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1987, J. Wiley and Sons, NY. También pueden llevarse a cabo etapas de purificación adicionales antes de llevar a cabo la etapa de detección de ADN, tales como, por ejemplo, una etapa de precipitación. Entre los métodos de detección pueden incluirse, aunque sin limitarse a ellos, la unión o intercalado de pigmentos específicos, tales como bromuro de etidio, que se intercala en el ADN de doble cadena y modifica su fluorescencia. El ADN purificado también puede separarse mediante métodos electroforéticos, opcionalmente tras una digestión de restricción, y visualizarse a continuación. También existen ensayos basados en sondas, los cuales explotan la hibridación de
35 oligonucleótidos con secuencias específicas y la posterior detección del híbrido. También resulta posible secuenciar el ADN tras etapas adicionales conocidas por el experto en la materia. La ADN polimerasa dependiente de molde preferente es la polimerasa Taq.

40 Por lo tanto, una realización preferente de la invención es el método de purificación anteriormente indicado, seguido de una etapa de determinación o detección, o métodos de purificación seguidos de una amplificación y una etapa de determinación o detección.

En otra realización de la invención, se proporciona un método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra, comprendiendo las etapas de:

- 45 (a) proporcionar una muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana,
 (b) proporcionar una pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebador,
 (c) amplificar el ácido nucleico diana,
 (d) poner en contacto la muestra con una sonda bajo condiciones de unión de la sonda al ácido nucleico diana,
 (e) detectar el producto de unión entre el ácido nucleico diana y la sonda a modo de indicación de la presencia
 50 del ácido nucleico diana,

caracterizado porque el primer cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 14, y en el que el segundo cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 16 y/o la sonda consiste de por lo menos 12 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 5 ó una secuencia complementaria de la misma.

55 Preferentemente, el método no comprende la etapa de proporcionar la muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana. Por lo tanto, en otra realización de la invención, se proporciona un método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra, comprendiendo las etapas de:

- 60 (a) amplificar el ácido nucleico diana en una muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana en presencia de una pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebador,
 (b) poner en contacto la muestra de la etapa a) con una sonda bajo condiciones de unión de la sonda al ácido

nucleico diana,

(c) detectar el producto de unión entre el ácido nucleico diana y la sonda a modo de indicación de la presencia del ácido nucleico diana, caracterizado porque el primer cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 14, y en la que el segundo cebador consiste de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 16, y la sonda consiste de por lo menos 12 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 5 ó una secuencia complementaria de la misma.

El término "sonda" se refiere a ácidos nucleicos producidos sintética o biológicamente (ADN o ARN) que, por su diseño o por la selección, contienen secuencias de nucleótidos específicas que les permiten hibridarse bajo astringencias predeterminadas definidas de manera específica (es decir, preferentemente) con "ácidos nucleicos diana". Una "sonda" puede identificarse como una "sonda de captura", en referencia a que "captura" el ácido nucleico diana de manera que puede separarse de materiales no deseables que podrían dificultar su detección. Tras llevar a cabo la separación, puede realizarse la detección del "ácido nucleico diana" capturado utilizando un procedimiento adecuado. Las "sondas de captura" con frecuencia ya se encuentran unidas a una fase sólida.

En el método según la invención, la sonda consiste preferentemente de por lo menos 12 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 10 ó una secuencia complementaria de la misma. Preferentemente, la sonda consiste de por lo menos 15 ó 18 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos de la invención. Más preferentemente, la sonda presenta la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 11 ó una secuencia complementaria de la misma.

El método según la invención puede llevarse a cabo en un formato para la utilización en el instrumento LightCycler[®], que se describe en la patente US nº 6.174.670. Este formato comprende la amplificación y detección, en el que ésta última utiliza la detección de la fluorescencia para la detección del producto de unión entre una pareja de sondas y el ácido nucleico diana. Estos formatos aplican la tecnología de transferencia por resonancia de fluorescencia (ver, por ejemplo, las patentes US nº 4.996.143, nº 5.565.322, nº 5.849.489 y nº 6.162.603) y se basan en el hecho de que al situar un donador y un marcaje fluorescente aceptor correspondiente a una determinada distancia uno de otro, tiene lugar la transferencia de energía entre los dos marcajes fluorescentes, la cual puede visualizarse o detectarse y/o cuantificarse de otra manera. Tal como se utiliza en la presente memoria, dos sondas, conteniendo cada una un marcaje fluorescente, en el que por lo menos una de las dos es un oligonucleótido según la invención, pueden hibridarse con un producto de amplificación en posiciones particulares determinadas por la complementariedad de las sondas con el ácido nucleico diana. El marcaje fluorescente según la invención del oligonucleótido según la invención puede ser un marcaje fluorescente donador o aceptor. Al hibridarse las sondas con el producto de amplificación en las posiciones apropiadas, se genera una señal de FRET. El análisis de la fluorescencia puede llevarse a cabo utilizando, por ejemplo, un sistema de microscopía epifluorescente de recuento de fotones (que contiene el espejo dicróico apropiado y filtros para el seguimiento de la emisión fluorescente en un intervalo particular), un sistema fotomultiplicador de recuento de fotones o un fluorímetro. La excitación para iniciar la transferencia de energía puede llevarse a cabo con un láser de ión argón, una lámpara de arco de mercurio de alta intensidad (Hg), una fuente lumínica de fibra óptica u otra fuente lumínica de alta intensidad apropiadamente filtrada para la excitación en el intervalo deseado. Tal como se utiliza en la presente memoria con respecto a las fracciones fluorescentes donante y aceptor correspondiente, "correspondiente" se refiere a una fracción fluorescente aceptor que presenta un espectro de emisión que se solapa con el espectro de excitación de la fracción fluorescente donadora. De acuerdo con lo anterior, puede producirse la transferencia eficiente de energía no radiativa entre las fracciones. El marcaje fluorescente preferente es la fluoresceína, a modo de marcaje fluorescente donador, en el que el marcaje fluorescente aceptor es la rodamina; sin embargo, resulta preferente un pigmento cianina, preferentemente Cy5, tal como se indica en la patente US nº 6.174.670.

El término "marcajes", al que con frecuencia se hace referencia como "grupos informadores", se refiere de manera general a grupos que constituyen un ácido nucleico, en particular el "compuesto oligomérico" o el "oligonucleótido modificado" según la invención, así como cualesquiera ácidos nucleicos unidos a los mismos distinguibles del resto del líquido, es decir, la muestra (los ácidos nucleicos que presentan unido un "marcaje" también pueden denominarse compuestos de unión a ácidos nucleicos marcados, sondas marcajes o simplemente sondas). Los marcajes preferentes según la invención son los marcajes fluorescentes, que son, por ejemplo, pigmentos fluorescentes tales como el pigmento fluoresceína, el pigmento rodamina, el pigmento cianina y el pigmento coumarina.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "relación de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia" y expresiones similares se refieren a la hibridación contigua de un "oligonucleótido" marcado con una "fracción fluorescente donadora" y otro "compuesto oligomérico" marcado con un "marcaje fluorescente donador" a un "ácido nucleico diana", de manera que el "marcaje fluorescente donador" puede transferir la energía resonante al "marcaje fluorescente aceptor", de manera que el "marcaje fluorescente aceptor" produce una emisión fluorescente medible. En el caso de que el "marcaje fluorescente donador" y el "marcaje fluorescente aceptor" se encuentren separados por una distancia excesiva, el "marcaje fluorescente donador" no podrá transferir energía por resonancia

al "marcaje fluorescente aceptor", de manera que el "marcaje fluorescente aceptor" emitirá fluorescencia medible, y por lo tanto el "marcaje fluorescente donador" y el "marcaje fluorescente aceptor" no se encontrarán en una relación de transferencia de energía por resonancia.

5 En una realización preferente de la invención, la sonda porta un marcaje. Preferentemente, se pone en contacto una sonda adicional que porta un marcaje con la muestra de la etapa d), de manera que se pone en contacto una pareja de sondas que consiste de una primera y una segunda sonda con la muestra de la etapa d).

10 En una realización preferente de la invención, se proporciona un método según la invención en el que dicha etapa de amplificación c) en el método según la invención comprende poner en contacto la muestra con dicha pareja de cebadores con el fin de producir un producto de amplificación en caso de encontrarse presentes los ácidos nucleicos diana en dicha muestra, en el que dicha etapa de hibridación d) comprende poner en contacto dicha muestra con la pareja de sondas, en el que los elementos de dicha pareja de sondas se hibridan con dicho producto de amplificación separados por no más de cinco nucleótidos, en el que la primera sonda de dicha pareja de sondas se encuentra marcada con un marcaje fluorescente donador y en el que la segunda sonda de dicha pareja de sondas se encuentra marcada con un marcaje fluorescente aceptor correspondiente, y detectar el producto de unión entre el ácido nucleico diana y la pareja de sondas de la etapa e) mediante la detección de la presencia o ausencia de transferencia de energía por resonancia fluorescente entre dicho marcaje fluorescente donador de dicha primera sonda y dicho marcaje fluorescente aceptor de dicha segunda sonda, en el que la presencia de transferencia de energía por resonancia fluorescente es indicativa de la presencia del ácido nucleico diana en la muestra, y en el que la ausencia de transferencia de energía por resonancia fluorescente es indicativa de la ausencia del ácido nucleico diana en la muestra.

25 Por lo tanto, en una realización de la invención, se proporciona un método para detectar la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra, comprendiendo las etapas de llevar a cabo por lo menos una etapa de ciclado, en el que una etapa de ciclado comprende una etapa de amplificación y una etapa de hibridación, en el que dicha etapa de amplificación comprende poner en contacto dicha muestra con cebadores, en el que un cebador es un oligonucleótido según la invención, con el fin de producir un producto de amplificación en el caso de que el ácido nucleico diana se encuentre presente en dicha muestra, en el que dicha etapa de hibridación comprende poner en contacto dicha muestra con la pareja de sondas, en el que los elementos de dicha pareja de sondas se hibridan con dicho producto de amplificación separados por no más de cinco nucleótidos, en el que una primera sonda de dicha pareja de sondas se encuentra marcada con un marcaje fluorescente donador y en el que una segunda sonda de dicha pareja de sondas se encuentra marcada con un marcaje fluorescente aceptor correspondiente, en el que una sonda puede ser un oligonucleótido según la invención, y detectar la presencia o ausencia de transferencia de energía por resonancia fluorescente entre dicho marcaje fluorescente donador de dicha primera sonda y dicho marcaje fluorescente aceptor de dicha segunda sonda, en el que la presencia de FRET es indicativa de la presencia del ácido nucleico diana en la muestra, y en el que la ausencia de FRET es indicativa de la ausencia del ácido nucleico diana en la muestra.

40 En otra realización preferente de la invención, se proporciona un método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra, comprendiendo las etapas de amplificar el ácido nucleico mediante reacción en cadena de polimerasa en presencia de dos sondas de ácidos nucleicos, en el que una sonda puede ser un oligonucleótido según la invención, las cuales se hibridan con regiones contiguas del ácido nucleico diana, marcando una de dichas sondas con un marcaje fluorescente aceptor y la otra sonda con marcaje fluorescente donador de una pareja de transferencia de energía fluorescente, de manera que, al hibridarse las dos sondas con el ácido nucleico diana, los marcajes fluorescentes donador y aceptor se encuentran separados por 25 ó menos nucleótidos, comprendiendo dicha reacción en cadena de la polimerasa las etapas de añadir una polimerasa termoestable, nucleótidos y cebadores, en las que un cebador puede ser un oligonucleótido según la invención, para el ácido nucleico diana, a la muestra y el ciclado térmico de la muestra entre por lo menos una temperatura de desnaturalización y una temperatura de alargamiento; excitar la muestra biológica con luz de una longitud de onda absorbida por el marcaje fluorescente donador y detectar la emisión fluorescente de la pareja de transferencia de energía fluorescente.

55 En otra realización preferente de la invención, se proporciona un método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra, comprendiendo las etapas de amplificar el ácido nucleico mediante reacción en cadena de polimerasa en presencia de dos sondas de ácidos nucleicos, en el que una sonda puede ser un oligonucleótido según la invención, las cuales se hibridan con regiones contiguas del ácido nucleico, marcando una de dichas sondas con un marcaje fluorescente aceptor y la otra sonda con marcaje fluorescente donador de una pareja de transferencia de energía fluorescente, de manera que, al hibridarse las dos sondas con el ácido nucleico diana, los marcajes fluorescentes donador y aceptor se encuentran separados por 25 ó menos nucleótidos, comprendiendo dicha reacción en cadena de la polimerasa las etapas de añadir una polimerasa termoestable, nucleótidos y cebadores, en las que un cebador puede ser un oligonucleótido según la invención, para el ácido nucleico diana, a la muestra y el ciclado térmico de la muestra entre por lo menos

una temperatura de desnaturalización y una temperatura de alargamiento; excitar la muestra con luz de una longitud de onda absorbida por el marcaje donador y realizando un seguimiento de la fluorescencia dependiente de la temperatura procedente de la pareja de transferencia de energía fluorescente.

5 En una realización preferente del método de la invención, se encuentra contemplado el formato utilizado en el ensayo TaqMan[®]. Este formato comprende la amplificación y la detección, en el que ésta última utiliza la detección de la fluorescencia para la detección del producto de unión de sonda y ácido nucleico diana. Por lo tanto, la sonda, que puede ser un oligonucleótido según la invención, comprende un marcaje, que preferentemente es un marcaje fluorescente, preferentemente fluoresceína. La sonda puede comprender además otros marcajes fluorescentes, en la que las longitudes de onda de emisión de uno de los marcajes fluorescentes se solapan con las longitudes de onda de absorción de otro de los marcajes fluorescentes. Preferentemente, la sonda comprende además un segundo marcaje fluorescente que actúa como agente desactivador, que desactiva la emisión de fluorescencia del marcaje fluorescente, que puede ser fluoresceína. Preferentemente el agente desactivador es una rodamina o cianina fluorescente. El agente desactivador también puede ser un compuesto o pigmento no fluorescente, tal como dabcilo ("desactivador oscuro"). La sonda no puede ser extendida enzimáticamente para ser utilizada como sonda en el formato TaqMan[®], tal como se indica de manera general en las patentes US nº 5.210.015, nº 5.478.972 ó nº 5.804.375. Preferentemente, la unidad monomérica en el extremo 3' del compuesto oligomérico es un 2',3'-dideoxynucleótido o un nucleótido 3'-fosforilado. En consecuencia, para el formato utilizado en el ensayo TaqMan[®], en la etapa de determinación del método, la relación espacial entre el marcaje fluorescente y el segundo marcaje, es decir, el agente desactivador, resulta alterado tras la hibridación, preferentemente mediante hidrólisis por exonucleasa de una ADN polimerasa dependiente de molde, preferentemente la polimerasa Taq, de la sonda, de manera que se produce la liberación del marcaje como resultado de la hidrólisis por la exonucleasa. Por lo tanto, en el método según la invención, el ácido nucleico diana de la etapa c) es amplificado por una ADN polimerasa dependiente de molde. El grado de hibridación entre el compuesto oligomérico según la invención y el ácido nucleico se determina a partir de la cantidad de marcaje que se libera de la sonda con la hibridación. Por lo tanto, es una realización preferente de la invención que en la etapa (d) se determine el grado de hibridación a partir de la cantidad de marcaje que se libera de la sonda hibridada con el ácido nucleico mediante hidrólisis por exonucleasa por la ADN polimerasa dependiente de molde.

30 Por lo tanto, más preferentemente, la sonda, que puede ser un oligonucleótido según la invención, porta un primer y un segundo marcajes. En la realización más preferente, en la etapa (e) el grado de hibridación o el producto de unión de la sonda y el ácido nucleico diana se determina a partir de la cantidad del primer o segundo marcaje fluorescente que se libera de la sonda hibridada con el ácido nucleico diana mediante hidrólisis por exonucleasa por la ADN polimerasa dependiente de molde.

35 En una realización muy preferente de la invención relacionada en mayor detalle con el formato de ensayo TaqMan[®], se proporciona un método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra, comprendiendo las etapas de:

40 (a) poner en contacto una muestra que comprende ácidos nucleicos de cadena sencilla con un cebador que contiene una secuencia complementaria a una región del ácido nucleico diana y una sonda que contiene un primer y un segundo marcajes fluorescentes, y en el que dicha sonda contiene una secuencia complementaria a una segunda región de la misma cadena de secuencia de ácido nucleico diana, pero que no incluye la secuencia de ácidos nucleicos definida por el cebador, creando una mezcla de dúplex bajo las condiciones de hibridación, en el que los dúplex comprenden el ácido nucleico diana apareado con el cebador y con la sonda, de manera que el extremo 3' del primer cebador se encuentra cadena arriba del extremo 5' de la sonda,

45 (b) mantener la mezcla de la etapa (a) que presenta una actividad de nucleasa 5' a 3' bajo condiciones suficientes para permitir que la actividad de nucleasa 5' a 3' de la polimerasa corte la sonda apareada y libere fragmentos marcados, y

50 (c) detectar y/o medir la liberación de los fragmentos marcados.

55 Para el método anteriormente descrito, los ácidos nucleicos pueden encontrarse presentes en forma de doble cadena o de cadena sencilla en el caso de que los ácidos nucleicos de doble cadena se desnaturalicen, es decir, se conviertan a cadena sencilla, antes de llevar a cabo el método mediante calentamiento, es decir, desnaturalización térmica.

En otra realización preferente, un cebador y/o la sonda puede modificarse químicamente, es decir, el cebador y/o la sonda comprenden un nucleótido modificado o un compuesto no nucleótido. La sonda o el cebador en este caso es un oligonucleótido modificado.

60 Los "nucleótidos modificados" (o "análogos de nucleótido") difieren de un "nucleótido" natural en alguna modificación, aunque todavía consisten de una base, un azúcar pentofuranosilo, una parte fosfato, de tipo base, una parte de tipo azúcar pentafuranosilo y una parte de tipo fosfato o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, puede unirse un "marcaje" a la parte base de un "nucleótido", obteniendo de esta manera un "nucleótido modificado".

También puede sustituirse una base natural en un "nucleótido" por, por ejemplo, una 7-desazapurina, de manera que también se obtiene un "nucleótido modificado". Las expresiones "nucleótido modificado" o "análogo de nucleótido" se utilizan intercambiamente en la presente solicitud. Un "nucleósido modificado" (o "análogo de nucleósido") difiere de un nucleósido natural en alguna modificación de la manera indicada de manera general anteriormente para un "nucleótido modificado" (o "análogo de nucleótido").

Un "compuesto no nucleótido" es diferente de un "nucleótido" natural, aunque en el sentido de la presente invención todavía es capaz -de manera similar a un "nucleótido"- de ser una "unidad monomérica" de un "compuesto oligomérico". Por lo tanto, un "compuesto no nucleótido" debe ser capaz de formar un "compuesto oligomérico" con "nucleótidos". Incluso los "compuestos no nucleótidos" pueden contener una parte de tipo base, de tipo azúcar pentofuranosilo o de tipo fosfato; sin embargo, no todos ellos se encuentran presentes simultáneamente en un "compuesto no nucleótido".

Un "oligonucleótido modificado" (o "análogo de oligonucleótido") pertenece a otro subgrupo específico de los "compuestos oligoméricos", que presenta uno o más "nucleótidos", uno o más "compuestos no nucleótidos" o "nucleótidos modificados" a modo de "unidades monoméricas". De esta manera, la expresión "oligonucleótido modificado" (o "análogo de oligonucleótido") se refiere a estructuras que funcionan de una manera sustancialmente similar a "oligonucleótido" y se utilizan intercambiamente en la totalidad de la memoria. Desde un punto de vista sintético, un "oligonucleótido modificado" (o un "análogo de oligonucleótido") puede prepararse mediante, por ejemplo, modificación química de "oligonucleótidos" mediante modificación apropiada del esqueleto de fosfatos, unidades de ribosa o bases nucleotídicas (Uhlmann y Peyman, Chemical Reviews 90:543, 1990; Verma S. y Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67:99-134, 1998). Entre las modificaciones representativas se incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosfonato de metilo, enlaces entre nucleósidos fosfotriéster o fosforamidato en lugar de enlaces entre nucleósidos fosfodiéster; purinas o pirimidinas deaza o aza en lugar de bases purinas y pirimidinas naturales, bases pirimidinas con grupos sustituyentes en la posición 5 ó 6, bases purinas con grupos sustituyentes alterados en las posiciones 2, 6 ó 8, o en la posición 7, tales como las 7-deazapurinas; azúcares que presentan grupos sustituyentes en, por ejemplo, su posición 2', o análogos de azúcares carbocíclicos o acíclicos. El experto en la materia conocerá otras modificaciones consistentes con el espíritu de la presente invención. Dichos "oligonucleótidos modificados" (o "análogos de oligonucleótidos") se describen mejor como funcionalmente intercambiables aunque estructuralmente diferentes de los "oligonucleótidos" naturales (o de "oligonucleótidos" sintéticos en líneas naturales). En más detalle, se dan a conocer modificaciones ejemplares en Verma S. y Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67:99-134, 1998, o en el documento WO n° 02/12263. Además, puede realizarse una modificación en la que las unidades nucleósidos se unen mediante grupos que sustituyen los enlaces de fosfato o de azúcar-fosfato entre nucleósidos. Entre dichos enlaces se incluyen los dados a conocer en Verma S. y Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67:99-134, 1998. En el caso de que se utilicen enlaces diferentes de los enlaces fosfato para unir las unidades nucleósido, dichas estructuras también se han descrito como "oligonucleósidos".

Otra realización preferente se refiere a la detección múltiple de diversos ácidos nucleicos diana, preferentemente diferentes virus. Por lo tanto, en una realización preferente de la invención se proporciona un método según la invención en el que se detectan otros ácidos nucleicos diana en la misma reacción. Preferentemente, los otros ácidos nucleicos diana comprenden ácidos nucleicos del virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo Occidental, el citomegalovirus (CMV), el virus de la inmunodeficiencia humana o patógenos bacterianos responsables de infecciones bacterianas tales como, por ejemplo, *Neisseria gonorrhoeae* o infecciones clamidiales.

Se da a conocer adicionalmente en la presente memoria un oligonucleótido en el que la secuencia de ácidos nucleicos del oligonucleótido se selecciona de entre las secuencias de ácidos nucleicos SEC ID n° 12 a n° 15, de entre las secuencias de ácidos nucleicos n° 10 ó n° 11, o de entre una secuencia complementaria de las mismas, o de entre las secuencias de ácidos nucleicos n° 16 ó n° 17. En una realización se proporciona un oligonucleótido que comprende un nucleótido modificado o un compuesto no nucleótido.

En otra realización de la invención se proporciona una pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebador, en la que la secuencia de ácidos nucleicos del primer cebador es SEC ID n° 14, y en la que la secuencia de ácidos nucleicos del segundo cebador es SEC ID n° 16.

La pareja de cebadores según la invención puede utilizarse en una reacción de hibridación con un ácido nucleico complementario. En otra realización de la invención, los oligonucleótidos según la invención se utilizan a modo de cebadores.

En otra realización la invención contempla un kit de partes en la que el kit contiene una polimerasa dependiente de molde que presenta actividad exonucleolítica 3' a 5', preferentemente la polimerasa Taq, nucleótidos y una pareja de cebadores según la invención. En otra realización de la invención se proporciona un kit que comprende una ADN polimerasa dependiente de molde, nucleótidos y una pareja de cebadores según la invención.

Dichos kits conocidos de la técnica comprenden además material de plástico que puede utilizarse durante el procedimiento de amplificación, tales como, por ejemplo, placas de microtitulación en el formato de 96 ó 384 pocillos o simplemente tubos de reacción ordinarios fabricados por, por ejemplo, Eppendorf, Hamburg, Alemania, y todos los demás reactivos para llevar a cabo el método según la invención.

En otra realización de la invención, el kit contiene reactivos adicionales para aislar el ácido nucleico. Por lo tanto, el kit puede contener además un material con una afinidad para ácidos nucleicos, preferentemente el material con una afinidad para los ácidos nucleicos comprende un material con una superficie de sílice. Preferentemente, el material con una superficie de sílice es un vidrio. Más preferentemente, el material con una afinidad para los ácidos nucleicos es una composición que comprende partículas vítreas magnéticas tal como se describe en los documentos n° WO 96/41811 y n° WO 01/37291. El kit puede comprender además o adicionalmente un tampón de lisis que contiene, por ejemplo, agentes caotrópicos, detergentes o alcoholes, o mezclas de los mismos, que permitan la lisis de las células y, separadamente, una proteasa, por ejemplo proteinasa K, para las digestiones de proteínas no deseadas. Estos componentes del kit según la invención pueden proporcionarse separadamente en tubos o recipientes de almacenamiento. Dependiendo de la naturaleza de los componentes, estos pueden proporcionarse incluso en un único tubo o recipiente de almacenamiento. El kit puede comprender además o adicionalmente una solución de lavado que resulte adecuada para la etapa de lavado de las partículas vítreas magnéticas cuando se encuentra unido a las mismas ADN o ARN. Esta solución de lavado puede contener etanol y/o agentes caotrópicos en una solución o soluciones tamponadas con un pH ácido sin etanol y/o agentes caotrópicos tal como se ha indicado anteriormente. Con frecuencia, la solución de lavado u otras soluciones se proporcionan en forma de soluciones madre que deben diluirse antes de la utilización. El kit puede comprender además o adicionalmente un eluyente o tampón de elución, es decir una solución o un tampón (por ejemplo Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) o agua pura para eluir el ADN o ARN unido a las partículas vítreas magnéticas. Además, pueden encontrarse presentes reactivos o soluciones tamponadas adicionales que pueden utilizarse para el procedimiento de purificación de un ácido nucleico, es decir, ADN o ARN.

Una realización preferente de la presente invención es la utilización del método o el kit de la presente invención en métodos automatizables, tal como se describe en, por ejemplo, el documento WO n° 99/16781. La expresión "método automatizable" se refiere a que las etapas del método resultan adecuadas para su realización con un aparato o máquina capaz de funcionar con poco o ningún control o influencia externo de un ser humano. La expresión "método automatizado" se refiere a que las etapas del método automatizable se llevan a cabo con un aparato o máquina capaz de funcionar con poco o ningún control o influencia externo de un ser humano. Únicamente las etapas de preparación para el método podría ser necesario que se realizasen manualmente, por ejemplo los recipientes de almacenamiento deben rellenarse y colocarse, la elección de las muestras debe ser realizada por un ser humano y etapas adicionales conocidas por el experto en la materia, por ejemplo la operación del ordenador de control. El aparato o máquina puede, por ejemplo, añadir automáticamente líquidos, mezclar las muestras o llevar a cabo etapas de incubación a temperaturas específicas. Típicamente, dicha máquina o aparato es un robot controlado por un ordenador que ejecuta un programa en el que se encuentran especificados las etapas y comandos individuales. Los métodos automatizados preferentes son aquellos que se llevan a cabo en un formato de alto rendimiento, lo que implica que los métodos y la máquina o aparato utilizado han sido optimizados para un rendimiento elevado de muestras en un tiempo corto. En otra realización de la invención, los métodos o los kits según la presente invención se utilizan en un procedimiento semiautomatizado, lo que implica que algunas etapas de reacción puede resultar necesario realizarlas manualmente. En una realización preferente de la invención, se extrae una suspensión que contiene PVM según la presente invención de un recipiente de almacenamiento y se añaden volúmenes parciales a diferentes recipientes de reacción. Los recipientes de reacción pueden ser tubos de reacción realizados en plástico, finalmente en formato de placa de microtitulación de 96 ó 384 ó más pocillos en los que puede llevarse a cabo una reacción. Sin embargo, estos recipientes pueden realizarse en otro material, por ejemplo en acero.

En realizaciones preferentes de la invención, el kit según la invención se utiliza para investigación, bioanálisis o diagnóstico. En realizaciones preferentes según la invención, el kit según la invención o el método según la invención se utiliza en un formato de alto rendimiento, es decir, en un método automatizado que permite el análisis de un número elevado de diferentes muestras en un tiempo muy corto.

Los ejemplos, referencias, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos proporcionados.

60 Descripción de las figuras

Figura 1 Curvas cinéticas de crecimiento de PCR para la combinación de cebadores STS12/16 conjuntamente con la sonda STS15 basadas en un eluido derivado de una muestra 1.000 IU/ml.

Las líneas verticales indican en qué punto las curvas de crecimiento cruzan el umbral; en otras palabras, en qué punto resulta detectable inicialmente una señal inequívoca y específica.

- 5 Figura 2 Curvas cinéticas de crecimiento de PCR para la combinación de cebadores STS13/16 conjuntamente con la sonda STS15 basadas en un eluido derivado de una muestra 1.000 IU/ml. Las líneas verticales indican en qué punto las curvas de crecimiento cruzan el umbral; en otras palabras, en qué punto resulta detectable inicialmente una señal inequívoca y específica.
- 10 Figura 3 Curvas cinéticas de crecimiento de PCR para la combinación de cebadores STS14/16 conjuntamente con la sonda STS15 basadas en un eluido derivado de una muestra 1.000 IU/ml. Las líneas verticales indican en qué punto las curvas de crecimiento cruzan el umbral; en otras palabras, en qué punto resulta detectable inicialmente una señal inequívoca y específica.
- 15 Figura 4 Análisis de los productos de amplificación derivados de los experimentos en el Ejemplo 1 mediante electroforesis estándar en gel de agarosa (sistema E-Gel, Invitrogene, Carlsbad, CA, USA). (Carril 1: escalera de 100 pb de ADN; 2: STS12/16: control de agua; 3: STS12/16: muestra 1.000 IU/ml; 4: STS12/16: muestra 1.000 IU/ml; 5: STS13/16: muestra 1.000 IU/ml; 6: STS13/16: muestra 1.000 IU/ml; 7: STS14/16: muestra 1.000 IU/ml; 8: STS14/16: muestra 1.000 IU/ml; 9: vacía; 10: escalera de 100 pb de ADN)
- 20 Figura 5 Curvas cinéticas de crecimiento de PCR para la combinación de cebadores STS14/16 en comparación con la combinación de cebadores STS17/18 conjuntamente con la sonda STS15 basadas en un eluido derivado de una muestra 1.000 IU/ml. Las líneas verticales indican en qué punto las curvas de crecimiento cruzan el umbral; en otras palabras, en qué punto resulta detectable inicialmente una señal inequívoca y específica.
- 25 Figura 6 Análisis de los productos de amplificación derivados de los experimentos en el Ejemplo 2 mediante electroforesis estándar en gel de agarosa (sistema E-Gel, Invitrogene, Carlsbad, CA, USA). (Carril 1: escalera de 100 pb de ADN; 2: muestra 50 IU/ml, positiva en PCR; 3: muestra 25 IU/ml, positiva en PCR; 4: muestra 25 IU/ml, negativa en PCR; 5: muestra 10 IU/ml, negativa en PCR; 6: muestra 10 IU/ml, negativa en PCR; 7: muestra 10 IU/ml, negativa en PCR; 8: muestra 10 IU/ml, positiva en PCR; 9: Control negativo, negativo en PCR; 10: Control negativo, negativo en PCR; 11: STS17/18: Control de agua, negativo en PCR; 12: escalera de 100 pb de ADN)
- 30 Figura 7 Curvas cinéticas de crecimiento de PCR para la combinación de cebadores STS17/18 conjuntamente con la sonda STS15 basadas en un eluido derivado de una muestra 10.000 IU/ml. Las líneas verticales indican en qué punto las curvas de crecimiento cruzan el umbral; en otras palabras, en qué punto resulta detectable inicialmente una señal inequívoca y específica.
- 35 Figura 8 Dibujo esquemático de la región diana en el genoma del parvovirus B19.

Ejemplos -Detección del parvovirus B19 mediante ensayo de ácidos nucleicos

Parte general:

- 45 La preparación de muestras de plasma-EDTA, plasma-citrato y suero humano se llevó a cabo utilizando el kit de aislamiento de ácidos nucleicos totales (TNAI) en el instrumento COBAS AmpliPrep (ambos de Roche Diagnostics GmbH, D-68305 Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante con un volumen de entrada de muestra de 200 µl. A continuación, se transfirieron manualmente 50 µl del eluido a tubos de PCR específicos (denominados tubos k) y se mezclaron con 50 µl de mezcla de reacción de PCR. La amplificación y detección de los ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante PCR cinética en el analizador COBAS TaqMan (Roche Diagnostics GmbH, D-68305 Mannheim, Alemania) con el perfil de PCR siguiente:
- 50

Etapa	Tipo	Pendiente de la rampa (0,1°C/s)	Temp. (°C)	Tiempo (s)	Retardo (s)	Número de ciclos
1	Calentamiento de la tapa	3	100,0			1
2	PreCiclo	12	50	300		1
4	PreCiclo	12	95	120		1
5	Inicio de la secuencia					

6	Desnaturalización	12	95,0	15		
7	Hibridación	12	58	25	25	
8	Final de la secuencia					60
9	PostCiclo	12	40	120		1

Ejemplo 1

Comparación entre diferentes combinaciones de cebadores

5

Se diseñó una sonda TaqMan (STS15) que comprendía una región altamente conservada del gen NS1. La sonda presentaba la secuencia SEC ID nº 11 5'-CCCCGGGACCAGTTCAGGAGAATCAT-3' (nt. 2.070-2.095 según Shade R.O. *et al.*, J. Virol. 58:921-936, 1986). La sonda presentaba una temperatura de fusión (T_m) de aprox. 80°C al aplicar el método del vecino más próximo (OLIGO, Molecular Biology Insights, Inc., CO, USA). A continuación, se

10

- T_f: 59°C a 63°C
- ningún desapareamiento o menos desapareamientos con las secuencias de eritrovirus publicadas, incluyendo las nuevas variantes recién descubiertas (Nguyen Q. T. *et al.*, Virology 301:374-80, 2002; Servant A. *et al.*, J. Virol. 76:9124-34, 2002),
- menos sitios de falso cebado,
- el cebador debería terminar con A o C.

15

Se consideró que las secuencias siguientes resultaban adecuadas y fueron sintetizadas:

20

STS12 (cebador directo): 5'-GTGGTGAAAGCTCTGAAGAA-3' (SEC ID nº 12)

STS13 (cebador directo): 5'-GAAACCCCGCGCTCTA-3' (SEC ID nº 13)

STS14 (cebador directo): 5'-AAACCCCGCGCTCTAGTA-3' (SEC ID nº 14)

STS17 (cebador directo): 5'-GAAACCCCGCGCTCTAGTAC-3' (SEC ID nº 15)

STS16 (cebador inv.): 5'-TTCCATCCATTATACCAAGC-3' (SEC ID nº 16)

25

STS18 (cebador inv.): 5'-CCCAACTAACAGTTCACGAA-3' (SEC ID nº 17)

Se evaluó el rendimiento de las combinaciones de cebadores STS12/16, STS13/16, STS14/16 y STS17/18 con la sonda STS15 y una mezcla de reacción de PCR que consistía de tricina 50 mM, pH 8,3, acetato potásico 100 mM, acetato de manganeso 3 mM, glicerol al 4%, dATP 300 mM, dCTP 300 mM, dGTP 300 mM, dTTP 50 mM, dUTP 500 mM, 10 U de uracil-N-glucosilasa, 40 U de polimerasa Z05, aptámero NTQ21-46A 200 nM, 400 nM de cada cebador y 100 nM de sonda. Las muestras que consistían de 500 y 1.000 IU/ml de ADN de parvovirus B19 se procesaron en un instrumento COBAS AmpliPrep utilizando el kit TNAI. Después, se mezclaron 50 ml del eluido correspondiente con una mezcla de reacción de 2 veces en un tubo k y se introdujeron en el analizador COBAS TaqMan para la

30

amplificación/detección.

35

Las figuras 1 a 3 muestran las curvas cinéticas de crecimiento de PCR para las combinaciones de cebadores STS12/16, STS13/16 y STS14/16, basadas en un eluido derivado de una muestra 1.000 IU/ml. Las líneas verticales indican en qué punto las curvas de crecimiento cruzan el umbral; en otras palabras, en qué punto resulta detectable inicialmente una señal inequívoca y específica. Los puntos de cruce de dichas líneas verticales con el eje x se determinaron como valores de umbral de ciclo (ct) y eran directamente proporcionales a la concentración de entrada de la secuencia diana. Cuanto menor es un valor ct, mayor es la entrada inicial de copias diana. A partir de las combinaciones de cebadores en la presente memoria, STS14/16 aparentemente es superior debido a sus valores más bajos de ct.

40

La figura 4 muestra el análisis de los amplicones correspondientes mediante electroforesis en gel de agarosa. Demuestra que las reacciones de PCR con las combinaciones de cebadores dadas muestran una reactividad cruzada, o amplificación de secuencias no específicas, nula o baja.

45

Se evaluó un segundo cebador inverso, STS18, conjuntamente con el cebador directo STS17 y se comparó la combinación de cebadores con STS14/16 con una mezcla de reacción y el protocolo de PCR indicado anteriormente. A modo de muestras se utilizaron eluidos derivados de extracciones replicadas de una muestra de 500 IU/ml. La figura 5 ilustra una comparación entre las dos combinaciones de cebadores. Tal como resulta evidente a partir de los resultados, STS17/18 fue seleccionado para experimentos adicionales, ya que comprendía los valores de ct más bajos, conjuntamente con las menores desviaciones de los mismos.

50

55

Ejemplo 2

Sensibilidad analítica con los cebadores STS17, STS18 y sonda STS15

- 5 Para la determinación de la sensibilidad, se procesó una serie de dilución del estándar de la Organización Mundial de la Salud para el ADN del parvovirus B19 (National Institute for Biological Standards and Control [NIBSC], 1° estándar internacional, 2000, ADN de parvovirus B19, 500.000 IU/ml, código 99/800) a partir de 1.000-10 IU/ml en plasma-EDTA, en doce réplicas utilizando el método de extracción descrito anteriormente con un volumen de entrada de muestra de 200 µl. Se transfirieron manualmente cincuenta microlitros de eluido a tubos K, se mezclaron con 50 µl de MMx activado y después se aplicaron a una PCR (para más datos, ver el Ejemplo 1). Con el algoritmo de análisis Probit se encontró que la sensibilidad era de 26 IU/ml con una tasa de acierto de 95%. La Tabla 1 resume los resultados del estudio e ilustra las tasas de acierto a las concentraciones de entrada correspondientes.
- 10 La figura 6 muestra el análisis de electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación seleccionados.

Tabla 1:

Nº	Concentración (IU/ml)	Número de pruebas	Número de positivos	Tasa de acierto
1	500	12	12	100%
2	400	12	12	100%
3	300	11	11	100%
4	200	12	12	100%
5	100	11	11	100%
6	75	12	12	100%
7	50	11	11	100%
8	25	11	10	91%
9	10	12	9	75%

Ejemplo 3

- 15 Ensayo de precisión con diferentes combinaciones de cebadores

- 20 Se evaluó la precisión con la combinación de cebadores STS17/18 en comparación con la combinación STS14/16 conjuntamente con la sonda STS15. El control de operación Pelispy Parvo-B19-DNA a una concentración de 10.000 IU/ml (VQC Laboratory, Alkmaar, NL) se extrajo en 46 réplicas en dos días diferentes siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Los eluidos se analizaron mediante PCR cinética tal como se indica en el Ejemplo 1. Se encontró que el CV global basado en los valores de ct era de 2,18% en el caso de la combinación de cebadores STS17/18, mientras que la combinación STS14/16 presentaba un CV de 4,89% (Tabla 2).

- 25 Tabla 2:

		Valores de ct	
		Combinación de cebadores STS14/STS16	Combinación de cebadores STS17/STS18
Día 1		39,8	35,1
		40,0	33,5
		41,6	34,3
		40,6	35,7
		41,2	36,9
		40,0	35,0
		40,6	34,3
		42,0	34,8
		40,0	35,1
		41,0	35,5
		41,0	35,4
		41,3	35,4
		40,9	34,8
		42,5	35,4
		41,3	33,2
		43,4	34,4
		40,9	35,1
		42,4	36,0
		43,2	36,7
		42,1	35,8
	44,4	35,5	

ES 2 422 583 T3

	41,8	35,3
	40,9	36,7
Día 2	39,8	35,5
	40,2	35,1
	36,4	34,5
	36,3	35,7
	37,8	35,8
	ND	34,5
	38,4	35,2
	40,2	35,4
	39,5	34,7
	37,5	35,2
	40,5	35,5
	36,2	35,6
	38,4	35,3
	39,5	35,9
	37,2	35,6
	38,6	37,4
	37,7	35,2
	41,7	35,5
	44,3	35,8
	38,6	36,4
	40,1	35,5
	39,0	34,8
	41,4	35,0
media	40,3	35,3
SD	1,968	0,770
CV	4,89	2,18

Ejemplo 4

Ensayo de especificidad con diferentes combinaciones de cebadores

5 Se evaluó la especificidad con diferentes combinaciones de cebadores y la sonda STS15 situada dentro del gen NS1 del genoma del parvovirus B19. Se adaptó el procedimiento general (mezcla de reacción, protocolo de PCR) del Ejemplo 1. El centro de donaciones de sangre de la Cruz Roja Alemana, Munich, BRD, proporcionó donaciones rutinarias frescas de sangre, las cuales se extrajeron tal como se ha indicado anteriormente. La Tabla 3, a
10 continuación, ilustra los resultados de dicho análisis y demuestra una especificidad de 100% para todas las combinaciones investigadas.

Tabla 3:

Nº int.	BRK-Plasma nº	Ensayo de PCR con STS13/STS16	Ensayo de PCR con STS14/STS16	Ensayo de PCR con STS17/STS18
301	0926091	negativo	ND	ND
302	0926033	negativo	negativo	negativo
303	0926094	negativo	negativo	negativo
304	0926037	negativo	negativo	negativo
305	0926086	negativo	negativo	negativo
306	0926038	ND	ND	negativo
307	0926092	ND	ND	negativo
308	0926049	ND	ND	negativo
309	0926061	ND	ND	negativo
310	0926068	ND	ND	negativo
311	0926042	ND	ND	negativo
312	0926076	ND	negativo	negativo
313	0926043	negativo	negativo	negativo
314	0926073	negativo	negativo	negativo
315	0926046	negativo	negativo	negativo
316	0926072	negativo	negativo	negativo

317	0926067	negativo	negativo	negativo
318	0926050	negativo	negativo	negativo
319	0926090	ND	ND	negativo
320	0926079	negativo	negativo	negativo
321	0926053	negativo	negativo	negativo
322	0926051	negativo	negativo	negativo
323	0926063	negativo	negativo	negativo
324	0926088	negativo	negativo	negativo
325	0926071	negativo	negativo	ND
326	0926034	negativo	negativo	negativo
327	0926039	negativo	negativo	negativo
328	0926087	negativo	negativo	negativo
329	0926095	negativo	negativo	negativo
330	0926036	negativo	negativo	negativo
331	0926093	negativo	negativo	negativo
332	0926064	negativo	negativo	negativo
333	0926065	negativo	negativo	negativo
334	0926085	negativo	negativo	negativo
335	0926029	negativo	negativo	negativo
336	0926032	negativo	negativo	negativo
337	0926082	ND	negativo	negativo
338	0926098	ND	negativo	negativo
339	0926047	negativo	negativo	negativo
340	0926097	negativo	negativo	negativo
341	0941982	negativo	negativo	negativo
342	0926069	negativo	negativo	negativo
343	0926041	negativo	negativo	negativo
344	0941983	negativo	negativo	negativo
345	0926066	negativo	negativo	negativo
346	0926035	negativo	negativo	negativo
347	0926089	negativo	ND	negativo
348	0926045	negativo	ND	negativo
349	0926084	ND	ND	ND
350	0941971	negativo	negativo	negativo
351	0926054	negativo	negativo	negativo
352	0941962	negativo	negativo	negativo
353	0926052	ND	negativo	negativo
354	0926081	negativo	negativo	negativo
355	0941985	negativo	negativo	negativo
356	0926080	negativo	negativo	negativo
357	0937866	negativo	negativo	negativo
358	0937882	negativo	negativo	negativo
359	0937864	negativo	negativo	negativo
360	0937861	negativo	negativo	negativo

Ejemplo 5

Influencia de la composición de la mezcla de reacción sobre la precisión de la PCR

5

10

15

El objetivo del experimento fue analizar si la composición de la mezcla de reacción presentaba una influencia significativa sobre la precisión de la reacción de PCR con diana en la región NS1 del parvovirus B19. La combinación de cebadores STS17/18 (concentración final de cada uno: 0,4 mM) y la sonda STS15 (concentración final: 0,1 mM) se añadieron a la mezcla de reacción indicada en el Ejemplo 4, así como a dos mezclas de reacción preformuladas que se encuentran disponibles comercialmente (kit de amplificación de ADN genérico COBAS TaqMan, kit de amplificación de ARN genérico COBAS TaqMan). El control operativo Pelispy Parvo-B19-DNA a una concentración de 10.000 IU/ml tal como se indica en el Ejemplo 3 se extrajo en 20 réplicas por cada mezcla de reacción y se analizó según el Ejemplo 1. La figura 7 demuestra que la mezcla de reacción comercial de ARN presenta los valores de ct más bajos, además de la mejor precisión, según su CV, que es el más bajo, de 0,5%, comparado con la mezcla de reacción comercial de ADN, con un CV de 4,4%, y la mezcla de reacción del propio laboratorio, con un CV de 2,3% (Tabla 4).

En la fig. 8 se muestra un estudio de la región diana en el genoma del parvovirus B19.

Tabla 4:

valores de ct con la combinación de cebadores STS17/STS18			
	mezcla de reacción del propio laboratorio	mezcla de reacción comercial genérica de ARN	mezcla de reacción comercial genérica de ADN
	35,2	31,2	47,7
	35,5	31,3	47,4
	35,2	31,1	49,1
	35,8	31,1	49,2
	34,9	30,8	50,6
	35,3	31,1	48,6
	36,0	30,6	44,8
	34,8	31,1	51,8
	34,7	31,2	50,1
	35,2	31,2	47,9
	35,1	31,2	49,6
	36,3	31,2	48,6
	37,3	31,0	52,1
	35,5	31,0	50,9
	34,9	31,1	50,1
	35,7	31,1	49,9
	37,3	31,2	55,9
	35,9	31,2	52,1
	37,2	31,1	48,9
	36,6	31,4	49,4
media	35,7	31,1	49,7
SD	0,811	0,166	2,191
CV	2,27	0,53	4,41

5

Lista de referencias

Abramson R. D. and Myers T. W., *Curr Opin Biotechnol* 4 (1993) 41-47
 Alderton R. P. *et al.*, *S., Anal. Biochem.* 201 (1992) 166-169
 10 Anderson M. J., *Lancet* 1 (1983) 1378
 Astell *et al.*, *J. Gen. Virol.* 68 (1987) 885-893
 Ausubel F. *et al.*: *Current Protocols in Molecular Biology* 1987, J. Wiley and Sons, NY
 Barany F., *PCR Methods and Applic.* 1 (1991) 5-16
 Barany F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 189-193
 15 Beaucage *et al.*, *Tetrahedron Letters* 22 (1981) 1859
 Boom R., *J Clin Microbiol* 28 (1990) 495-503
 Brown E. L., *et al.*, *Methods in Enzymology* 68 (1979) 109-151
 Brown K. E., *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 13 (2000) 245-259 Carriere C. *et al.*, *J Virol Methods* 44
 (1993), 221-234 Cohen B., *BMJ* 311 (1995) 1549-1552 Cotmore S. F. *et al.*, *J. Virol.* 60:548-557, 1986
 20 Cubie H. A. *et al.*, *Mol Cell Probes* 9 (1995), 59-66
 DE 3724442
 DE 3734442
 Dorsch S. *et al.*, *J. Gen. Virol.* (2001) 82, 191-199
 Dux S. *et al.*, *Dtsch Med Wochenschr* 127 (2002) 1584-1588
 25 Enders E: *Infections of the fetus and the neonate other than rubella.* Topley & Wilson's Microbiology and Microbial
 Infections. Editado por Collier L. London, Edward Arnold, 1998, páginas 873 a 915
 Enders G. *et al.*, *Clin Infect Dis* 26 (1998) 355-358
 EP 0439182
 EP 238 893
 30 EP 783 580
 Erdman D. D. *et al.*, *J Gen Virol* 77 (1996), 2767-2774
 Garegg *et al.*, *Chem. Scr.* 25 (1985) 280-282
 GB 91/00212
 Guatelli J.C., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 1874-1878
 35 Hemauer A. *et al.*, *J. Gen. Virol.* (1996) 77, 1781-1785

- Hicks K. E. *et al.*, Arch Virol. 141 (1996), 1319-1327
Holloway B. *et al.*, Nucleic Acids Res 21 (1993), 3905-3906
Jakobi R. *et al.*, Anal. Biochem. 175 (1988) 196-201
Jordan J. A. *et al.*, Mol. Diagn. 1 (1996), 321-328
5 JP 04088985
JP 11221099
JP 147986/1995
Jungkind D., J Clin Virol 20 (2001) 1-6
Kwoh D. Y. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 1173-1177
10 Marko M. A. *et al.*, Anal. Biochem. 121 (1982) 382-387
Narang S. A. *et al.*, Methods in Enzymology 68 (1979) 90-98
Nguyen Q. T. *et al.*, Virology 301 (2002) 374-80
Oligonucleotide Synthesis, Gait, M.J., editor, 1984; Nucleic Acid Hybridization, Hames, B.D., and Higgins, S.J.,
editores, 1984; and a series, Methods in Enzymology, Academic Press, Inc., la totalidad de los cuales se
15 incorpora como referencia en la presente memoria
Ozawa K. *et al.*, J. Virol. 62 (1988) 2508-2511
Pattison J. R. *et al.*, Lancet 1 (1981) 664-665
RU2146372
20 Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring
Harbor, New York, 1989
Sato K. *et al.*, J Clin Microbiol 38 (2000) 1241-1243
Schorling S. *et al.*, J. Mol. Diagn. 6 (2004) 37-41
Servant A. *et al.*, J. Virol. 76 (2002) 9124-34
Shade R. O. *et al.*, J. Virol. 58 (1986) 921-936
25 Stelzl E. *et al.*, J Clin Microbiol 40 (2002) 1447-1450
Takahashi N. *et al.*, FEBS Lett. 450 (1999) 289-293
Turton J. *et al.*, Epidemiol Infect 105 (1990) 197-201
Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews 90 (1990) 543
Umene K. and Nunoue T., J. Gen. Virol. 76 (1995) 2645-2651
30 US 4.458.066
US 4.996.143
US 5.130.238
US 5.210.015
US 5.386.024
35 US 5.478.972
US 5.487.972
US 5.565.322
US 5.585.254
US 5.804.375
40 US 5.849.489
US 6.103.476
US 6.162.603
US 6.174.670
US 6.183.999
45 US 6.268.349
US 6.274.307
Vassias I. *et al.*, J. Virol. Meth. 44 (1993) 329-338
Verma S., and Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 99-134
Vogelstein B. *et al.*, Proc. Natl. Acad. USA 76 (1979) 615-9
50 Walsh, 1979, Enzymatic Reaction Mechanisms. W. H. Freeman and Company, San Francisco, Capítulo 3
Whelen A. C. and Persing D. H., Annu. Rev. Microbiol. 50 (1996) 349-373
WO 00/24917
WO 01/06019
WO 01/14593
55 WO 01/37291
WO 02/00924
WO 02/096925
WO 02/12263
WO 03/002753
60 WO 90/01069
WO 91/04330
WO 92/08808
WO 96/41811

WO 98/04730

WO 99/16781

WO 99/28439

Wu D. Y. y Wallace R. B., *Genomics* 4 (1989) 560-69

Yoto Y. *et al.*, *Lancet* 347 (1996) 868-9

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH

5 <120> Nuevos cebadores y sondas para la detección del parvovirus B19

<130> 22398 WO

<150> EP 04002854.0

10 <151> 2004-02-10

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.2

15

<210> 1

<211> 349

<212> ADN

<213> Parvovirus B19

20

<400> 1

```

gtggtgaaag ctctgaagaa ctcagtgaaa gcagcttttt taacctcatc accccaggcg      60
cctggaacac tgaaaccccg cgctctagta cgcccatccc cgggaccagt tcaggagaat      120
catttgtcgg aagcccagtt tcctccgaag ttgtagctgc atcgtgggaa gaagccttct      180
acacaccttt ggcagaccag tttcgtgaac tgttagtgg ggttgattat gtgtgggacg      240
gtgtaagggg tttacctgtg tgttgtgtgc aacatattaa caatagtggg ggagggttgg      300
gactttgtcc ccattgcatt aatgtagggg cttggtataa tggatggaa      349
    
```

25

<210> 2

<211> 95

<212> ADN

<213> Parvovirus B19

<400> 2

```

gtggtgaaag ctctgaagaa ctcagtgaaa gcagcttttt taacctcatc accccaggcg      60
cctggaacac tgaaaccccg cgctctagta cgccc 95
    
```

30

<210> 3

<211> 29

<212> ADN

<213> Parvovirus B19

<400> 3

tcaaccctca ctaacagttc acgaaactg 29

<210> 4

<211> 32

<212> ADN

<213> Parvovirus B19

<400> 4

ttccatccat tataccaagc ccctacatta at 32

<210> 5

<211> 55

<212> ADN
<213> Parvovirus B19

<400> 5
tccccgggac cagtcagga gaatcattg tcggaagccc agtttctcc gaagt 55

<210> 6
<211> 35
<212> ADN
<213> Parvovirus B19

<400> 6
cagtggtggt gaaagctctg aagaactcag tgaaa 35

<210> 7
<211> 34
<212> ADN
<213> Parvovirus B19

<400> 7
ctggaacct gaaacccgc gctctagtag gcc 34

<210> 8
<211> 29
<212> ADN
<213> Parvovirus B19

<400> 8
tcaaccccaa ctaacagttc acgaaactg 29

<210> 9
<211> 24
<212> ADN
<213> Parvovirus B19

<400> 9
aaatttccat ccattatacc aagc 24

<210> 10
<211> 37
<212> ADN
<213> Parvovirus B19

<400> 10
ccccgggacc agttcaggag aatcattgt cggaagc 37

<210> 11
<211> 26
<212> ADN
<213> Parvovirus B19

<400> 11
ccccgggacc agttcaggag aatcat 26

<210> 12 .
<211> 20

<212> ADN
<213> Parvovirus B19

<400> 12
gtggtgaaag ctctgaagaa 20

<210> 13
<211> 16
<212> ADN
<213> Parvovirus B19

<400> 13
gaaaccccg cgtcta 16

<210> 14
<211> 18
<212> ADN
<213> Parvovirus B19

<900> 14
aaacccg cgtctagta 18

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Parvovirus B19

<400> 15
gaaaccccg cgtctagtac 20

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Parvovirus B19

5 <400> 16
ttccatccat tataccaagc 20

10 <210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Parvovirus B19

<400> 17
ccaactaac agtcacgaa 20

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra, comprendiendo las etapas de:
- (a) proporcionar una muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana,
 (b) proporcionar una pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebador, en la que el primer cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 14, y en la que el segundo cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 16,
 10 (c) amplificar el ácido nucleico diana,
 (d) detectar el ácido nucleico diana amplificado de la etapa (c).
- 15 2. Método según la reivindicación 1, que comprende además, entre las etapas (c) y (d), (c1) poner en contacto la muestra con una sonda bajo condiciones de unión de la sonda al ácido nucleico diana, y en el que la etapa (d) comprende:
 detectar el producto de unión entre el ácido nucleico diana y la sonda a modo de indicación de la presencia del ácido nucleico diana.
- 20 3. Método según la reivindicación 2, en el que la sonda consiste de por lo menos 12 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 5 ó una secuencia complementaria de la misma.
4. Método según la reivindicación 2 ó 3, en el que la sonda porta un marcaje.
- 25 5. Método según la reivindicación 4, en el que se pone en contacto una sonda adicional que porta un marcaje con la muestra de la etapa d), de manera que una pareja de sondas que consiste de una primera y una segunda sonda se pone en contacto con la muestra de la etapa d).
- 30 6. Método según la reivindicación 5, en el que dicha etapa de amplificación c) comprende poner en contacto la muestra con dicha pareja de cebadores, produciendo un producto de amplificación en el caso de que el ácido nucleico diana se encuentre presente en dicha muestra, en el que dicha etapa de hibridación d) comprende poner en contacto dicha muestra con la pareja de sondas, en el que los elementos de dicha pareja de sondas se hibridan con dicho producto de amplificación separados por no más de cinco nucleótidos, en la que la primera sonda de dicha pareja de sondas se encuentra marcada con un marcaje fluorescente donador y en la que la segunda sonda de dicha pareja de sondas se encuentra marcada con un marcaje fluorescente aceptor correspondiente,
 35 y detectar el producto de unión entre el ácido nucleico diana y la pareja de sondas de la etapa e) mediante la detección de la presencia o ausencia de transferencia de energía por resonancia fluorescente entre dicho marcaje fluorescente donador de dicha primera sonda y dicho marcaje fluorescente aceptor de dicha segunda sonda, en el que la presencia de transferencia de energía por resonancia fluorescente es indicativa de la presencia del ácido nucleico diana en la muestra, y en el que la ausencia de transferencia de energía por resonancia fluorescente es indicativa de la ausencia del ácido nucleico diana en la muestra.
- 40 7. Método según la reivindicación 2 ó 3, en el que la sonda porta un primer y un segundo marcajes.
- 45 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ácido nucleico diana de la etapa c) es amplificado por una ADN polimerasa dependiente de molde.
- 50 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en el que el producto de unión entre el ácido nucleico diana y la sonda de la etapa (d) se detecta a partir de la cantidad del primer o segundo marcaje fluorescente que se libera de la sonda hibridada con el ácido nucleico diana mediante hidrólisis por exonucleasa por la ADN polimerasa dependiente de molde.
- 55 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que la sonda consiste de por lo menos 12 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 10 ó una secuencia complementaria de la misma.
- 60 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que la sonda presenta la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 11 ó una secuencia complementaria de la misma.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, en el que el cebador y/o la sonda comprende un nucleótido modificado o un compuesto no nucleótido.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en el que se detectan otros ácidos nucleicos diana en la misma reacción.

- 5 14. Método según la reivindicación 13, en el que los demás ácidos nucleicos diana comprenden ácidos nucleicos del virus de la hepatitis A, del virus de la hepatitis B, del virus de la hepatitis C, del virus del Nilo Occidental o del virus de la inmunodeficiencia humana.
15. Pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebador, en el que la secuencia de ácidos nucleicos del primer cebador consiste de la secuencia SEC ID n° 14, y en el que la secuencia de ácidos nucleicos del segundo cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 16.
- 10 16. Utilización de una pareja de cebadores según la reivindicación 15 en una reacción de hibridación con un ácido nucleico complementario.
- 15 17. Kit que comprende una ADN polimerasa dependiente de molde, nucleótidos y una pareja de cebadores según la reivindicación 15.

Fig. 1

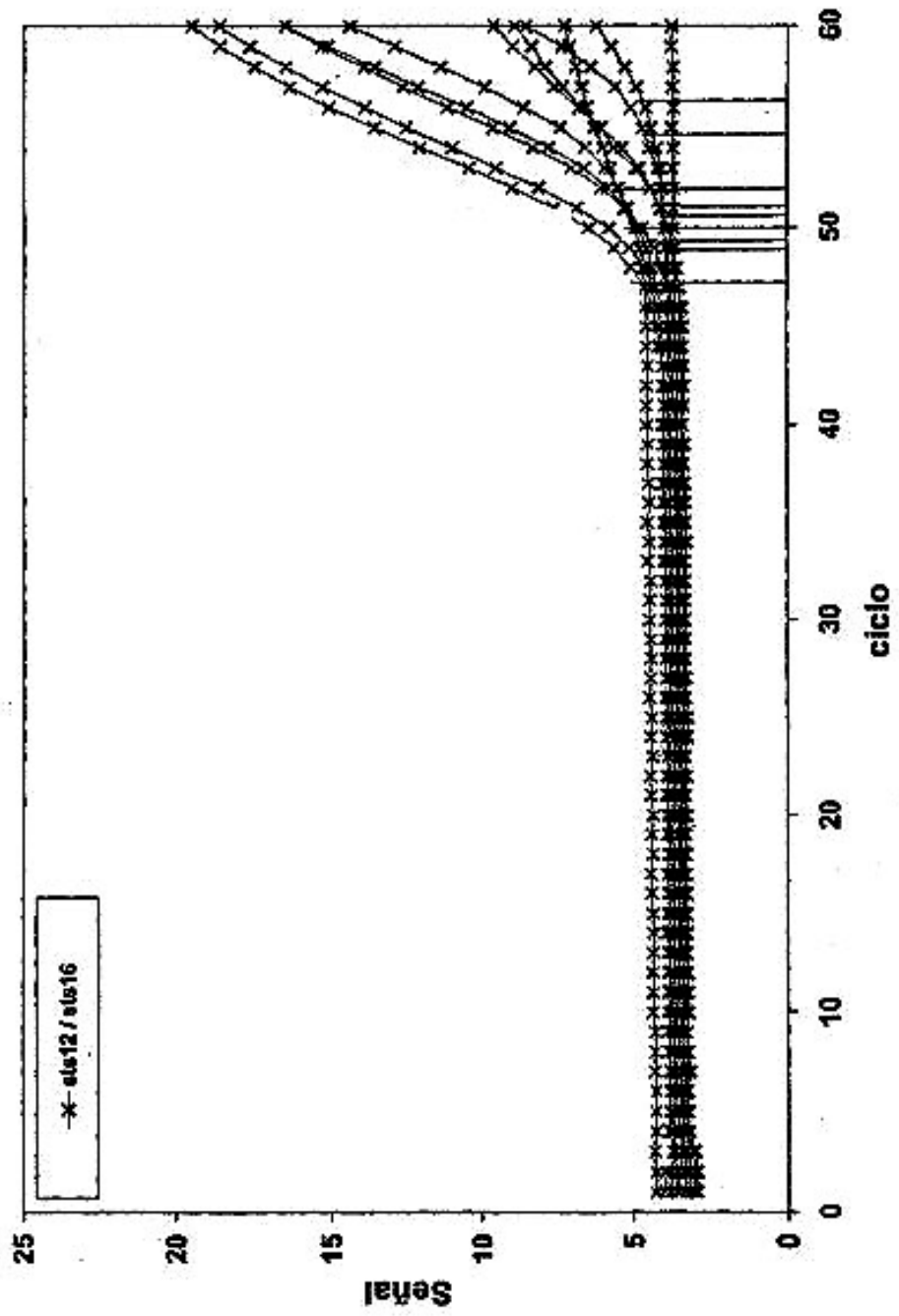


Fig. 2

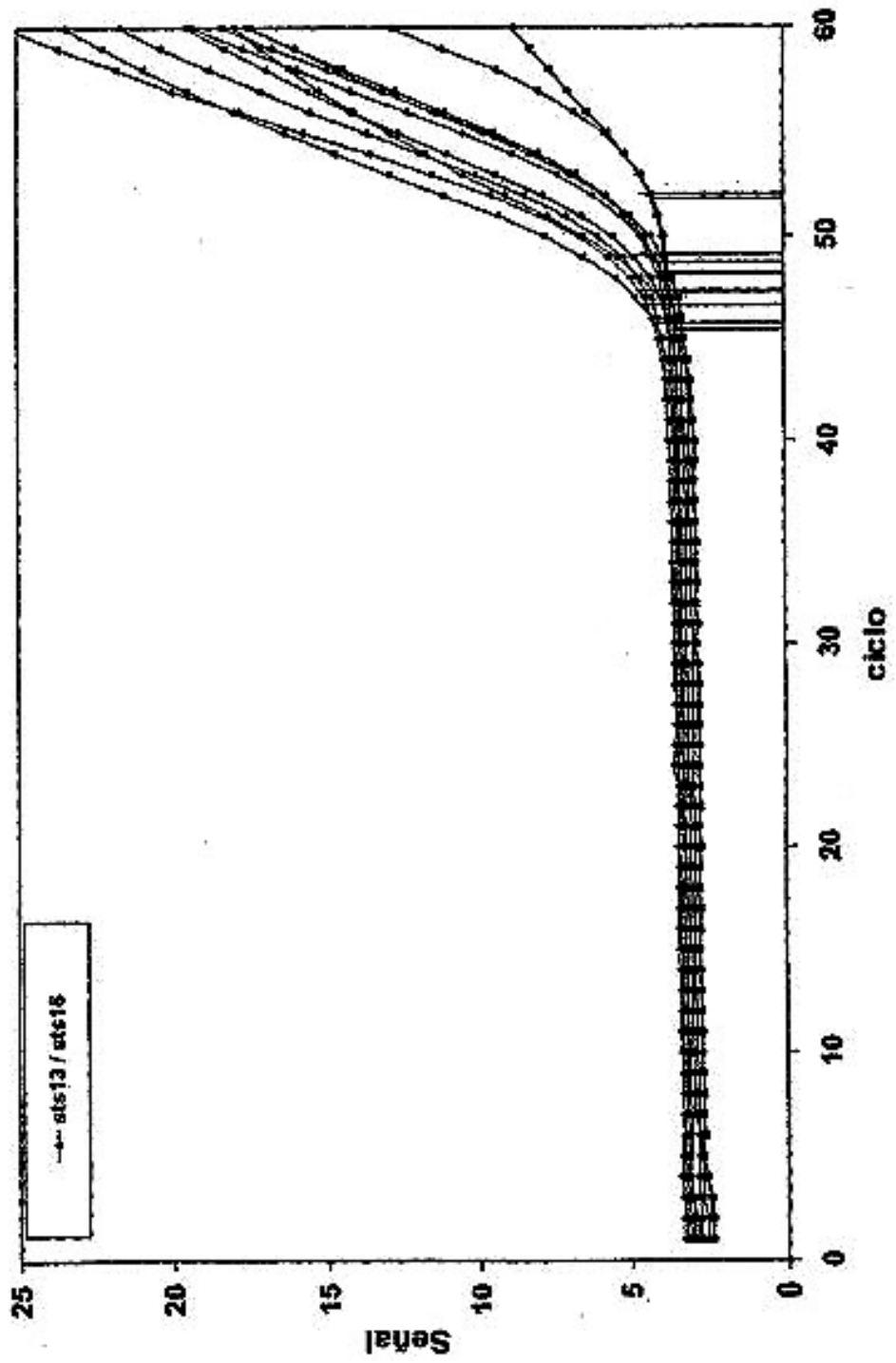


Fig. 3

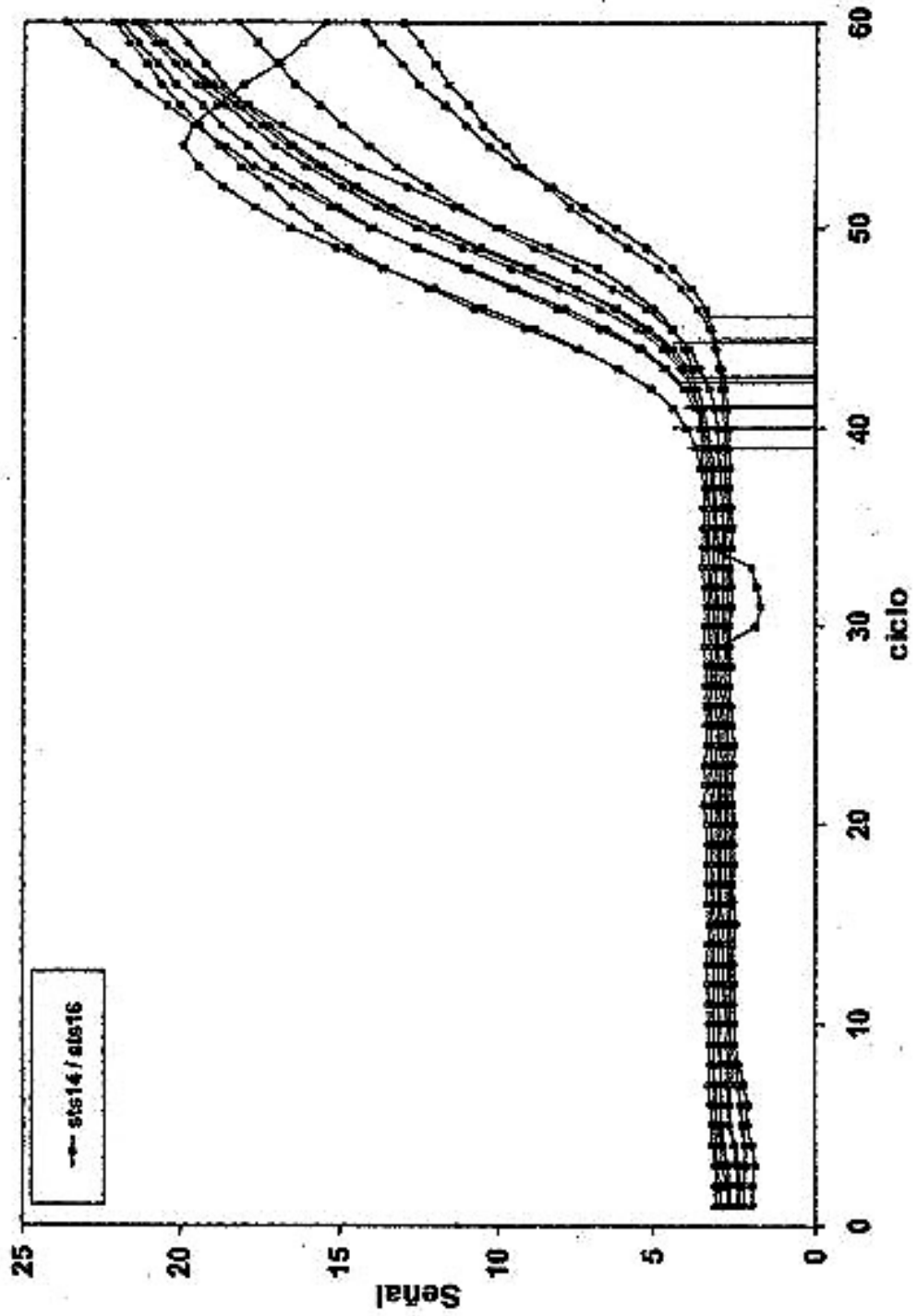


Fig. 4

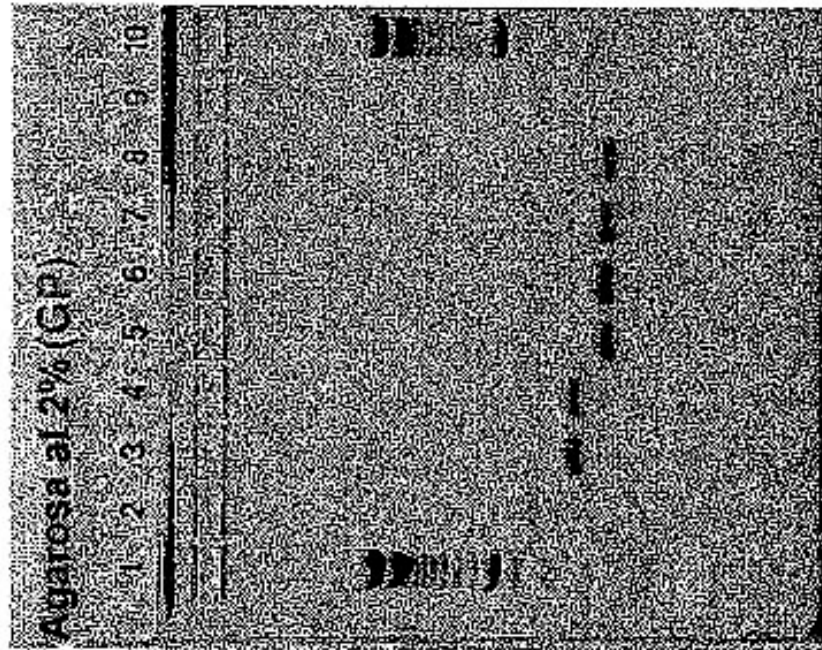


Fig. 5

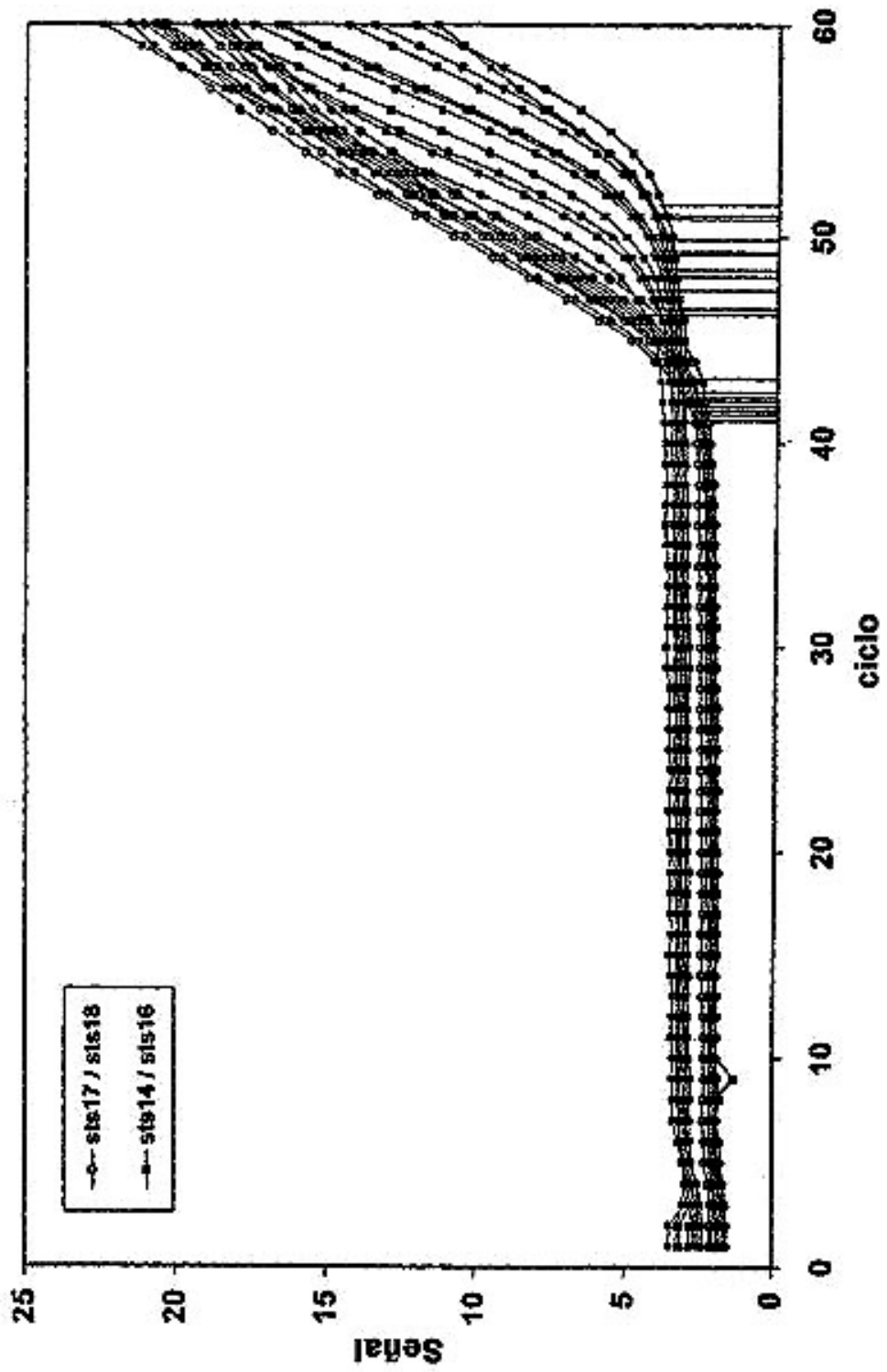


Fig. 6

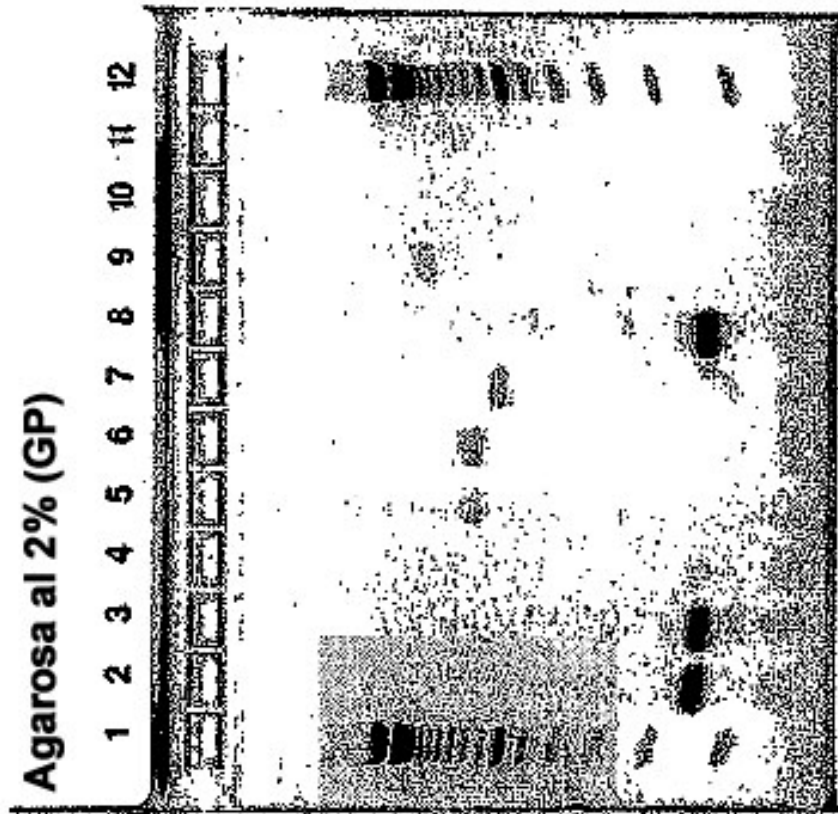


Fig. 7

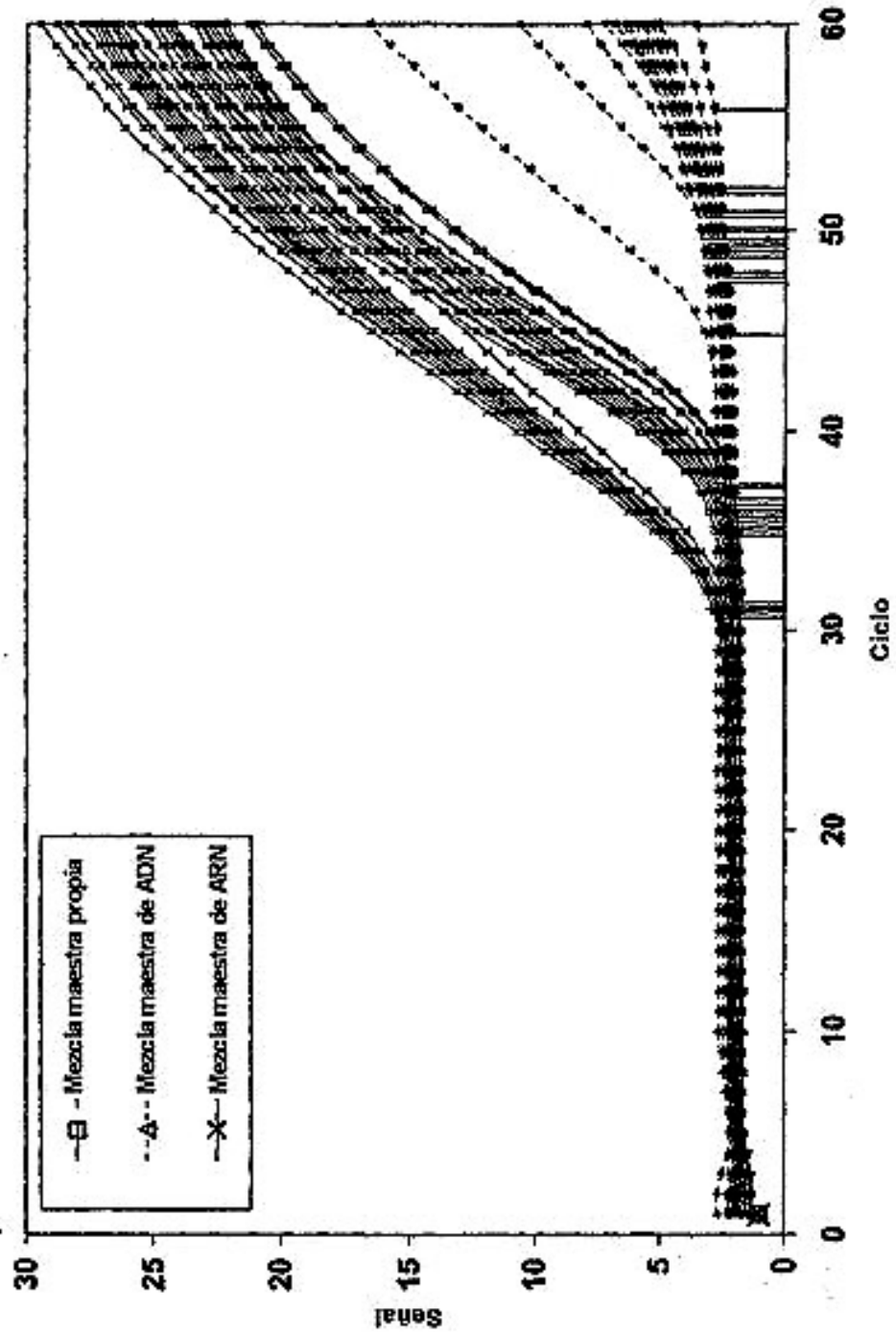


Fig. 8:

