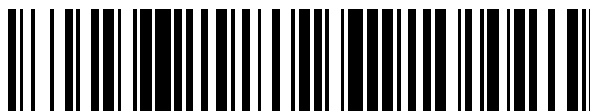


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 578**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.1998 E 10183902 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 2336367**

54 Título: **Secuencias de ácidos nucleicos que se pueden usar como cebadores y sondas en la amplificación y detección de todos los subtipos del VIH-1**

30 Prioridad:

08.08.1997 EP 97202455

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.01.2014

73 Titular/es:

**BIOMERIEUX B.V. (100.0%)
Boseind 15
5281 RM Boxtel, NL**

72 Inventor/es:

**GOUDSMIT, JAAP;
OUDSHOORN, PIETER;
JURRIAANS, SUZANNE y
LUKASHOV, VLADIMIR VLADIMIROVICH**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 438 578 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

Secuencias de ácidos nucleicos que se pueden usar como cebadores y sondas en la amplificación y detección de todos los subtipos del VIH-1

La presente invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que se pueden usar en el campo de los diagnósticos de virus, más específicamente el diagnóstico de infecciones con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) causado por el virus de la inmunodeficiencia humana (abreviadamente en lo sucesivo VIH en español, correspondiente a la abreviatura inglesa HIV).

Aunque los diagnósticos convencionales de virus se han basado predominantemente en la detección de antígenos virales o sus anticuerpos específicos, en los últimos años la atención se ha desplazado hacia métodos para la detección directa del genoma de los virus o las secuencias de ácidos nucleicos procedentes de dicho genoma, tanto RNA como DNA. Estos métodos se basan usualmente en hibridación de ácidos nucleicos. La hibridación de ácidos nucleicos se basa en la capacidad de las dos cadenas de ácido nucleico que contienen secuencias complementarias en asociarse una con la otra en condiciones apropiadas, formando por tanto una estructura de dos cadenas o bicatenaria. Cuando se marca la cadena complementaria, se puede detectar el marcador y es indicativo de la presencia de la secuencia diana. Especialmente en combinación con los métodos para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos, estos métodos han llegado a ser una herramienta importante en el diagnóstico viral, en particular para la detección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos son especialmente útiles como otra técnica más en casos en los que los métodos serológicos den resultados dudosos o en casos en los que puede haber un periodo de tiempo considerable entre la infección y el desarrollo de anticuerpos para el virus. Con el VIH, la seroconversión puede ocurrir usualmente unos 3-6 meses después de la exposición al virus. Por tanto, mientras que no se detecten anticuerpos con inmunoensayos convencionales, el DNA proviral o el RNA viral circulante puede ser ya detectable. También en monitorización de terapias antivirales, los métodos basados en amplificación de ácidos nucleicos tienen varias ventajas sobre los métodos serológicos. Especialmente los métodos de amplificación cuantitativa proporcionan una herramienta útil para determinar los cambios en la cantidad de virus presentes antes y durante la terapia.

La elección de los oligonucleótidos que se han de usar como cebadores y sondas en la amplificación y detección de secuencias de ácidos nucleicos es crítica para la sensibilidad y especificidad del ensayo. La secuencia que ha de ser amplificada está usualmente presente solo en una muestra (por ejemplo una muestra de sangre obtenida de un paciente que se sospecha que tiene una infección viral) en cantidades minúsculas. Los cebadores deben ser suficientemente complementarios de la secuencia diana para permitir una amplificación eficaz del ácido nucleico viral presente en la muestra. Si los cebadores no se asocian adecuadamente (debido a un desapareamiento de las bases de los nucleótidos en ambas cadenas) con la secuencia diana, la amplificación se obstaculiza fuertemente. Esto afectará a la sensibilidad del ensayo y puede dar lugar a resultados de ensayo negativos falsos. Debido a la heterogeneidad de los genomas virales se pueden obtener resultados de ensayo negativos falsos si los cebadores y las sondas son capaces de reconocer secuencias presentes en solamente parte de las variantes del virus. El virus VIH muestra una alta heterogeneidad. La variabilidad genética ha sido demostrada entre aislados de diferentes continentes pero también entre individuos y entre diferentes fases o etapas de la enfermedad. Basándose en análisis de secuencias se han identificado dos grupos dentro del VIH-1: el grupo M (debiéndose la letra M al término inglés "major" (principal)), y el grupo O (debiéndose la letra O al término inglés "outlier" (raro)). Dentro del grupo M, han sido asignados los subtipos (A-H) que constituye cada uno un conjunto separado filogenético de secuencias, y están siendo identificados otros subtipos. Esta variación de secuencias no está distribuida uniformemente a lo largo del genoma. El genoma de VIH-1 como todos los genomas retrovirales, consiste aproximadamente en las siguientes regiones: El gen *gag* del genoma de VIH-1 es la región que codifica las proteínas del núcleo del virus (por ejemplo, *p24*). El gen *env* codifica una proteína precursora grande, *gp160*, que es procesada en las proteínas de la envuelta *gp120* y *gp41*. El gen *pol* codifica la polimerasa del virus (transcriptasa inversa). Las regiones terminales repetidas largas (abreviadamente en lo sucesivo LTR por la expresión inglesa *Long Terminal Repeat*) son las regiones del genoma viral que participan en la integración del virus con la célula hospedante y en la regulación de la transcripción de los genes virales. Algunas regiones son más propensas que otras a variaciones de secuencia. Especialmente en el dominio *env* la variación de secuencia puede ser tan alta como 30% entre miembros de los diferentes subtipos. Idealmente, la selección del cebador se debe basar en el conocimiento de la variabilidad entre cepas en las secuencias del cebador candidato y las consecuencias del desapareamiento en los sitios del cebador. McCutchan et al., *J. AIDS*, 4, 1241-1250, 1991, usaron la reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo abreviadamente PCR) para realizar una comparación genética de diferentes aislados del VIH-1. Usando la PCR anclada (se usaron cebadores de sentido variable con un cebador antisentido constante. Los cebadores fueron elegidos de regiones relativamente conservadas en *gag*, *env* y *LTR*). También se investigó el efecto del desapareamiento de cebadores sobre la cantidad de producto de obtenido por la PCR. El desapareamiento en el extremo 3' del cebador disminuyó la cantidad de producto en algunas ocasiones más de 100 veces.

La detección de todos los subtipos actualmente conocidos del VIH-1 es de gran importancia, especialmente con respecto al tratamiento del paciente, la seguridad de la sangre y hemoderivados y estudios clínicos y epidemiológicos. Los ensayos actuales para la amplificación y subsiguiente detección de secuencias de ácidos nucleicos procedentes del VIH-1 se basan usualmente en la amplificación de secuencias de la región *gap* del genoma viral. Estos

ensayos se han desarrollado para el subtipo B, que es el subtipo principal en los países europeos y en los Estados Unidos de América. Sin embargo, la presencia de otros subtipos, que antes estaban confinados geográficamente, es creciente debido a los frecuentes viajes entre estos países y, por ejemplo, los países africanos. Por tanto, se necesitan ensayos sensibles que sean capaces de detectar tantas variantes del virus VIH-1 como sea posible, preferiblemente todas.

La investigación dirigida a identificar conjuntos de cebadores adecuados para la amplificación viable de secuencias de ácidos nucleicos derivados VIH-1 ha ido creciendo durante los pasados años. Engelbrecht et al., *J. Virol. Meth.*, 55, 391-400, 1995, describen un estudio dirigido al desarrollo de un protocolo de PCR específico y sensible usando pares de cebadores para *env*, *gag* y *LTR* para detectar subtipos presentes en Western Cape, Sudáfrica. Se analizaron veinticuatro cepas que se sabía que pertenecían a los subtipos B, C y D. Se encontró que el comportamiento de los pares de cebadores era muy dependiente de la optimización de las condiciones de reacción para los diferentes pares de cebadores. Solamente cuando se usaron condiciones menos rigurosas (por ejemplo, con el par de cebadores para *LTR* se requirieron un tiempo de ciclo más largo y menores temperaturas de asociación) pudieron detectarse estas cepas particulares del VIH con suficiente sensibilidad y reproducibilidad con todos los pares de cebadores.

Zazzi et al., *J. Med. Virol.*, 38, 172-174, 1992, desarrollaron una PCR de dos etapas (usando cebadores anidados) para la detección del DNA del VIH-1 en muestras clínicas. Los cebadores usados para la amplificación procedían del gen *gag* y la región *LTR*. Los pacientes analizados en este estudio eran todos de zonas próximas, lo que probablemente hace que representen solamente un número limitado de cepas virales diferentes.

Vener et al., en *Bio Techniques*, 21, 248-255, 1996, describieron un método de PCR cuantitativa que usaba cebadores anidados precedentes de *LTR*. Este método se analizó solamente en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) infectadas con VIH-1 MN. Por tanto, no se puede decir nada acerca de la idoneidad de los cebadores usados para detectar diferentes subtipos de los virus.

Con la presente invención se proporcionan secuencias de nucleótidos que se pueden usar como cebadores y sondas en la amplificación y detección de ácido nucleico del VIH-1. Las secuencias de oligonucleótidos proporcionadas por la presente invención están localizadas en la parte *LTR* del genoma viral del VIH. Se ha encontrado que usando las secuencias de la presente invención en métodos para la amplificación y detección de ácidos nucleicos se puede obtener una detección sensible específica del VIH-1. El beneficio de las secuencias de la presente invención reside principalmente en el hecho de que, con ayuda de cebadores y sondas que comprenden las secuencias de acuerdo con la invención, se pueden detectar con alta precisión y sensibilidad el ácido nucleico de todos los subtipos del VIH-1 actualmente conocidos. Hasta ahora no se han desarrollado pares de cebadores ni sondas de hibridación que permitieran la detección de una amplia gama de variantes del VIH-1.

Las secuencias de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención son especialmente útiles en métodos para la amplificación de ácidos nucleicos.

Se conocen en la técnica diversos métodos para amplificar ácidos nucleicos. Un ejemplo de un método para la amplificación de un segmento diana de DNA es la denominada "reacción en cadena de la polimerasa" (PCR). Con la técnica PCR el número de copias de un segmento diana particular es aumentado exponencialmente con un número de ciclos. Se usa un par de cebadores y en cada ciclo un cebador de DNA se asocia al lado 3' de cada una de las dos cadenas de la secuencia diana de DNA bicatenario. Los cebadores se prolongan con una DNA-polimerasa en presencia de los diversos mononucleótidos para generar de nuevo DNA bicatenario. Las cadenas del DNA bicatenario se separan una de la otra por desnaturalización térmica y cada cadena sirve como molde para la asociación con el cebador y subsiguiente prolongación en un ciclo siguiente. El método de la PCR ha sido descrito por Saiki et al., en *Science* 230, 135, 1985 y en las patentes europeas N° EP 200362 y EP 201184.

Otra técnica para la amplificación de ácidos nucleicos es el denominado sistema de amplificación basado en la transcripción (abreviadamente TAS por la expresión *Transcription based Amplification System*). El método TAS está descrito en la solicitud de patente internacional N° WO 88/10315, Las técnicas de amplificación basadas en la transcripción comprenden usualmente tratar el ácido nucleico diana con dos oligonucleótidos, uno de los cuales comprende una secuencia de promotor para generar un molde que incluye un promotor funcional. Las copias múltiples de RNA se transcriben desde dicho molde y pueden servir como base para posterior amplificación.

Un método de amplificación basado en la transcripción continua isoterma es el denominado proceso de amplificación basado en la secuencia de ácidos nucleicos (abreviadamente NASBA por la expresión inglesa *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) que se describe en la patente europea N° EP 329822. NASBA incluye el uso de RNA-polimerasa de T7 para transcribir múltiples copias de RNA desde un molde que incluye un promotor de T7. Otras técnicas de amplificación basadas en la transcripción se describen en la patente EP 408295. La patente EP 408295 se refiere principalmente a un método de amplificación basado en la transcripción de dos enzimas. Los métodos de amplificación basados en la transcripción, tales como el método NASBA como se describen la patente EP 329822, se emplean usualmente con un conjunto de oligonucleótidos, uno de los cuales está provisto de una secuencia de promotor que es reconocida por una RNA-polimerasa dependiente de DNA, tal como, por ejemplo, polimerasa de T7. En la técnica se conocen diversas modificaciones de los métodos basados en la transcripción. Estas modificaciones comprenden, por ejemplo, el uso de oligonucleótidos bloqueados (que pueden estar provistos de una secuencia de

promotor). Dichos oligonucleótidos se bloquean de modo que inhiban una reacción de prolongación resultante de los mismos (Patente de EE.UU. 5.554.516). Uno o más "promotores-cebadores" (oligonucleótidos provistos de una secuencia de promotor) se pueden usar en las técnicas de amplificación basadas en la transcripción, opcionalmente combinados con el uso de uno o más oligonucleótidos que no están provistos de una secuencia de promotor. Para la amplificación de RNA es una tecnología preferida la técnica de amplificación basada en la transcripción. La amplificación que usa PCR, se puede basar también en un molde de RNA. La PCR real necesita estar precedida por una etapa de transcripción inversa para copiar el RNA en DNA (abreviadamente RT-PCR por la expresión inglesa *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*). Sin embargo, si se usa RT-PCR para la detección de transcritos virales es necesaria la diferenciación de productos de PCR derivados de mRNA y de DNA. Se puede emplear un tratamiento con DNasa antes de la RT-PCR (Bitsch, A. et al., *J. Infect. Dis.* 167, 740-743, 1993; Meyer, T. et al., *Mol. Cell Probes* 8, 261-271, 1994), pero a veces fracasa en eliminar suficientemente el DNA contaminante (Bitsch, A. et al., 1983).

Por el contrario, con la RT-PCR, el método NASBA, que está basado en la transcripción de RNA por RNA-polimerasa de T7 (Kievits et al., 1991; Compton, 1991) no necesita diferenciación entre productos de amplificación procedentes de RNA o DNA, puesto que usa RNA como su diana principal. NASBA permite la amplificación específica de dianas de RNA incluso en un fondo de DNA.

Los oligonucleótidos de acuerdo con la invención son para uso con cualquier técnica de amplificación basada en la transcripción o cualquiera de sus modificaciones particulares. Es evidente que los oligonucleótidos de acuerdo con la invención encuentran uso en muchas técnicas diferentes de amplificación de ácidos nucleicos y diversos métodos para detectar la presencia de ácido nucleico de VIH amplificado. Los oligonucleótidos de la presente invención pueden ser usados análogamente en métodos de amplificación cuantitativa. Un ejemplo de dichos métodos cuantitativos se describe en la patente europea EP 525882.

El término "oligonucleótido" como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula constituida por dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos. Dichos oligonucleótidos se pueden usar como cebadores y sondas.

Naturalmente, se pueden preparar también análogos de oligonucleótidos basándose en las secuencias de oligonucleótidos de la presente invención. Dichos análogos pueden constituir estructuras alternativas, tales como "PNA" (moléculas con una cadena principal similar a un péptido en lugar de la cadena principal de fosfato y azúcar del ácido nucleico normal) o similares. Es evidente que estas estructuras alternativas, que representan las secuencias de la presente invención son igualmente parte de la presente invención.

El término "cebador" como se usa en la presente memoria se refiere a un oligonucleótido bien sea natural (por ejemplo, un fragmento de restricción) o bien sea producido sintéticamente, que sea capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis de un producto de prolongación del cebador que es complementario de una cadena de ácido nucleico (secuencia molde o diana) cuando se coloca en condiciones adecuadas (por ejemplo, tampón, sal, temperatura y pH) en presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización de ácidos nucleicos, tal como una polimerasa dependiente de DNA o dependiente de RNA. Un cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de los productos de prolongación en presencia de un agente de polimerización. Un cebador típico contiene al menos alrededor de 10 nucleótidos de longitud de una secuencia sustancialmente complementaria u homóloga a la secuencia diana, pero se prefieren cebadores algo más largos. Usualmente los cebadores contienen alrededor de 15-26 nucleótidos, pero se pueden emplear cebadores más largos, especialmente cuando los cebadores contienen secuencias adicionales, tales como una secuencia de promotor para una polimerasa particular.

Normalmente, un conjunto de cebadores consistirá en al menos dos cebadores, un cebador para la posición "aguas arriba" (hacia el extremo 5') y otro para la posición "aguas abajo" (para el extremo 3') que juntos definen el material amplificado (la secuencia que será amplificada usando dichos cebadores).

Principalmente para el uso en técnicas de amplificación basadas en la transcripción, los oligonucleótidos de acuerdo con la invención pueden estar enlazados también a una secuencia de promotor. El término "secuencia de promotor" define una región de una secuencia de ácido nucleico que es reconocida específicamente por una RNA-polimerasa que se une a una secuencia reconocida e inicia el proceso de transcripción por el cual se produce el RNA transcrito. En principio, se puede emplear cualquier secuencia de promotor para la cual haya una polimerasa conocida y disponible que sea capaz de reconocer la secuencia de iniciación. Los promotores conocidos y útiles son los que son reconocidos por ciertas RNA-polimerasas de bacteriófagos, tales como los bacteriófagos T3, T7 o SP6. Los oligonucleótidos unidos a una secuencia de promotor se denominan usualmente "promotores-cebadores". Su función como cebador, por ejemplo, el punto de partida para una reacción de prolongación puede ser bloqueada, sin embargo, como ya se ha mencionado antes, o estar ausente en algunas realizaciones de las reacciones de amplificación basadas en la transcripción.

Un oligonucleótido como se describe en la presente memoria es sustancialmente complementario de una secuencia de la región LTR de una secuencia de ácidos nucleicos de un genoma del VIH, estando basado dicho oligonucleótido en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

SEQ ID 1: G GGC GCC **ACT GCT AGA GA**
 SEQ ID 4: CTG CTT **AAA** GCC TCA **ATA AA**
 SEQ ID 5: CTC **AAT AAA** GCT TGC CTT GA
 SEQ ID 6: TCT GGT AAC TAG AGA TCC CTC
 5 SEQ ID 7: TAG TGT GTG CCC GTC TGT
 SEQ ID 8: AGT GTG TGC CCG TCT GTT
 o una de sus secuencias complementarias.

La presente invención que se refiere a un par de oligonucleótidos, para uso como un conjunto en la amplificación de una secuencia diana localizada dentro de la región LTR del genoma del VIH-1, consiste en un primer oligonucleótido que tiene una longitud de 26-50 nucleótidos y que comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

SEQ ID 1: G GGC GCC ACT GCT AGA GA

y un segundo oligonucleótido que tiene una longitud de 18-26 nucleótidos y que comprende al menos un fragmento de 10 nucleótidos de la secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

SEQ ID 4: CTG CTT **AM** GCC TCA **ATA AA**

15 Debe entenderse que los oligonucleótidos que consisten en las secuencias pueden contener delecciones, adiciones y/o sustituciones de poca entidad de bases de ácidos nucleicos, en un número en el que dichas alteraciones no afecten negativamente al rendimiento o producto obtenido en un grado significativo. Cuando los oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención se usan como sondas, las alteraciones no deben dar como resultado una disminución de la eficacia de hibridación de la sonda. Por ejemplo, en el caso de técnicas de amplificación basadas en la transcripción, en las que uno o más de los cebadores puede estar provisto de una secuencia de promotor, la introducción de una secuencia de hibridación rica en purina (=G o A), justamente después de la secuencia de promotor puede tener efectos positivos sobre la transcripción (cuando puede ocurrir que haya una transcripción abortiva de C y T). Si dicha secuencia no está disponible en el ácido nucleico diana se puede insertar una secuencia rica en purina en el oligonucleótido justo después de los tres últimos residuos de G de la secuencia de promotor.

25 Las secuencias de la presente invención se reflejan como secuencias de DNA. Los equivalentes de RNA de estas secuencias son igualmente parte de la presente invención.

Los oligonucleótidos preferidos de acuerdo con la invención son oligonucleótidos que consisten esencialmente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

30 SEQ ID 1: G GGC GCC **ACT GCT AGA GA**
 SEQ ID 4: CTG CTT **AM** GCC TCA **ATA AA**
 SEQ ID 5: CTC **AAT AAA** GCT TGC CTT GA
 SEQ ID 6: TCT GGT **AAC TAG AGA** TCC CTC
 SEQ ID 7: TAG TGT GTG CCC GTC TGT
 SEQ ID 8: AGT GTG TGC CCG TCT GTT
 35 SEQ ID 9: aat tct aat acg act cac tat agg gAG AGG GGC GCC ACT GCT AGA GA

La SEQ ID 9 realmente comprende la secuencia que es reflejada por la SEQ ID1. En la SEQ ID 9 las secuencias de SEQ ID 1 están unidas operativamente a una secuencia de promotor (la secuencia del promotor de T7). Esto hace a las secuencias especialmente adecuadas para uso como cebador situado aguas arriba (hacia 5') en una técnica de amplificación basada en la transcripción, tal como NASBA.

45 Uno de los oligonucleótidos puede servir como un "oligonucleótido aguas arriba", es decir, un cebador aguas arriba, mientras que el segundo oligonucleótido sirve como un "oligonucleótido aguas abajo", es decir, un cebador aguas abajo, en la reacción de amplificación. La situación en el genoma del VIH (o la secuencia complementaria del mismo) a la cual pueden asociarse ambos oligonucleótidos constituidos por dicho par de acuerdo con la invención, definirán conjuntamente la secuencia del ácido nucleico que se amplifica. La secuencia amplificada está situada entre los "sitios de unión a los cebadores" dentro de la región LTR del genoma del VIH. Se ha encontrado que usando un par de oligonucleótidos de acuerdo con la invención en una reacción de amplificación basada en la transcripción, se puede conseguir una amplificación precisa y fiable del ácido nucleico procedente de todos los subtipos del VIH actualmente conocidos.

50 Parte de los oligonucleótidos descritos en la presente memoria son particularmente adecuados para uso como sonda en la detección de ácido nucleico amplificado con un par de oligonucleótidos de acuerdo con la invención. Cuando se usan como una sonda, dichos oligonucleótidos pueden estar provistos de un marcador detectable. Los oligonucleótidos de acuerdo con la invención que son especialmente adecuados como sonda consisten esencialmente en las secuencias:

55 SEQ ID 6: TCT GGT AAC TAG AGA TCC CTC
 SEQ ID 7: TAG TGT GTG CCC GTC TGT o
 SEQ ID 8: AGT GTG TGC CCG TCT GTT

provistas de un marcador detectable. Un oligonucleótido más preferido a este respecto es un oligonucleótido con una secuencia como la representada en SEQ ID 6.

Se conocen en la técnica diversos restos marcadores. Dicho resto puede ser, por ejemplo, un compuesto radiactivo, una enzima detectable (por ejemplo, peroxidasa de rábano silvestre (HRP)), un hapteno como biotina o cualquier otro resto capaz de generar una señal detectable, tal como una señal colorimétrica, fluorescente, quimioluminiscente o electroquimioluminiscente.

Se pueden detectar también por otros métodos conocidos por los expertos en la técnica híbridos entre oligonucleótidos de acuerdo con la invención y ácido nucleico diana (amplificado).

Evidentemente los métodos para la amplificación de ácido nucleico usando los oligonucleótidos basados en la transcripción de acuerdo con la presente invención son también parte de la invención.

La presente invención proporciona además kits de ensayo para la amplificación y detección de ácido nucleico del VIH. El uso de dichos kits de ensayo permite el cribado preciso y sensible de muestras sospechosas de contener ácido nucleico derivado del VIH. Dichos kits de ensayo pueden contener una par de oligonucleótidos de acuerdo con la invención y opcionalmente también un oligonucleótido como se describe en la presente memoria que se puede usar como una sonda para la detección del material amplificado. Además el kit de ensayo puede contener reactivos de amplificación adecuados. Estos reactivos son, por ejemplo, las enzimas adecuadas para llevar a cabo la reacción de amplificación. Un kit, adaptado para uso con el método NASBA, puede contener por ejemplo cantidades adecuadas de transcriptasa inversa, RNasa H, y RNA-polimerasa de T7. Dichas enzimas pueden estar presentes en el kit en una solución tamponada, pero análogamente pueden ser proporcionadas en forma de una composición liofilizada, por ejemplo, una partícula esférica liofilizada. Dichas partículas liofilizadas han sido descritas en la solicitud de patente PCT N° EP 95/01268. El kit puede estar además provisto de composiciones tampón, adecuadas para llevar a cabo una reacción de amplificación. Dichos tampones pueden ser optimizados para la técnica de amplificación particular a la cual está destinado el kit, así como para uso con los oligonucleótidos particulares que están incluidos en el kit. En las técnicas de amplificación basadas en la transcripción, tales como NASBA, dichos tampones pueden contener, por ejemplo, DMSO, que potencia la reacción de amplificación (como se describe en la solicitud de patente PCT US90/04733).

Además el kit puede estar provisto de un control interno como una comprobación del método de amplificación y para impedir la presentación de resultados de ensayo falsos negativos debido a fallos en el método de amplificación. El uso de controles internos en las técnicas de amplificación basadas en la transcripción se describe en la solicitud de patente N° EP 93/02248. Una secuencia de control óptima se selecciona de tal modo que no compita con el ácido nucleico diana en la reacción de amplificación. Los kits pueden contener también reactivos para el aislamiento del ácido nucleico de la muestra biológica antes de la amplificación. Un método adecuado para el aislamiento del ácido nucleico se describe en la patente EP 389063.

Breve descripción de la Figura

Figura 1: Productos de amplificación después de transferencia y detección por luminiscencia mejorada obtenida después de la amplificación en presencia (panel A) o ausencia (panel B) de RNA del VIH-1 usando los siguientes pares de cebadores. Pista 1: SEQ ID 9-SEQ ID 10; pista 2 SEQ ID 9-SEQ ID 5; pista 3 SEQ ID 10-SEQ ID 4; pista 4: SEQ ID 10-SEQ ID 5; pista 5 SEQ ID 3-SEQ ID 12.

Ejemplos

Ejemplo 1: Amplificación y detección del RNA genómico del VIH-1.

Se aplicaron los siguientes procedimientos para amplificar y detectar el RNA genómico del VIH-1 en muestras, como se describe en los siguientes ejemplos.

Preparación de las muestras y aislamiento de los ácidos nucleicos.

El aislamiento de los ácidos nucleicos se realizó de acuerdo con Boom et al., 1990, *Journal of Clinical Microbiology* 28, 495-503 y la patente europea n° EP 0389063. En resumen: un volumen de 200 µL de mezcla de plasmas procedentes de donantes sanos (negativo para HBSAg, anti-VIH y anti-VHC) se añadió a 900 µL de tampón de lisis (Tris-HCl 47 mM, pH 7,2, EDTA 20 mM, Triton X-100 al 1,2%, tiocianato de guanidina 4,7 M (GuSCN, Fluka, Buchs, Suiza)). Después de agitar con vórtice y centrifugar (30 segundos, 13.000 rpm) se añadió una serie de diluciones del patrón subtipo B de RNA del VIH-1, caracterizado y descrito por Layne et al., 1992, *Virology* 189, 695-714 o de muestras positivas al VIH-1. Por adición de 50 µL de silicio activado (0,4 g/mL de suspensión en HCl 0,1 N), la suspensión se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación regular con vórtice. Después de centrifugación (30 – 60 segundos, 13.000 rpm) el pelet de silicio se lavó dos veces con 1 mL de tampón de lavado (GuSCN 5,25 M, Tris-HCl 50 mM, pH 6,4), seguido de dos lavados con etanol al 70% y una etapa de lavado con acetona. Posteriormente, los pelets de silicio se secaron durante diez minutos en un bloque de calentamiento a 56°C. Se eluyeron los ácidos nucleicos del silicio añadiendo 50 µL de tampón de elución (Tris-HCl 1,0 mM, pH 8,5) e incubación a 56°C durante 10 minutos. Posteriormente, se tomaron 5 µL del eluato del pelet para su uso posterior en

la reacción de amplificación. El eluato restante se conservó a -70°C.

Amplificación NASBA

Las amplificaciones se realizaron en un volumen de reacción de 20 µL que estaba compuesto de 10 µL de mezcla de cebadores, 5 µL de ácidos nucleicos (aislados) y 5 µL de mezcla de enzimas. La mezcla de cebadores se preparó por reconstitución de una *accusphere* liofilizada en 50 µL de diluyente para *accusphere*, 51,6 µL de agua, 8,4 µL de KCl 2 M y 5 µL de cada cebador (10 µM). La mezcla se agitó con vórtice exhaustivamente antes de su uso. 10 µL de esta mezcla de cebadores se añadieron a 5 µL del ARN (patrón) del VIH-1 (aislado). Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a 65°C y posteriormente se incubó a 41°C durante otros 5 minutos. Después de estas incubaciones se añadieron 5 µL de mezcla de enzimas y se incubó durante 5 minutos a 41°C. Los tubos se transfirieron a la zona de detección y se incubaron durante 90 minutos a 41°C. Después de la reacción de amplificación, los tubos se conservaron a 20°C hasta su uso posterior.

Cada reacción de amplificación contenía los siguientes reactivos:

Tris-HCl 40 mM, pH 8,5

MgCl₂ 12 mM

KCl 70 mM

dimetilsulfóxido al 15% v/v

ditriotretitol 5 mM

1 mM de cada desoxinucleósido-trifosfato

2 mM de los nucleósidos rATP, rCTP, rUTP

rGTP 1,5 mM

ITP 0,5 mM

0,105 µg/µL de BSA

0,08 unidades de RNasa H

32 unidades de RNA-polimerasa de T7

6,4 unidades de transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (Seikagaku, USA)

0,2 µM de cada cebador

sorbitol 375 mM

sacarosa 45,6 mM

manitol 28,5 mM

dextrano T40 0,13 mM.

Detección de los productos amplificados.

A. Electroforesis en gel.

La presencia de productos amplificados se analizó usando un gel de agarosa (100 mL de Pronarosa al 2% y 0,5 µg/mL de bromuro de etidio) y el tampón de desarrollo 1* TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). La electroforesis se realizó a 100 voltios durante aproximadamente 30 minutos. Las bandas teñidas con bromuro de etidio de los productos amplificados se visualizaron usando irradiación con UV. La transferencia se hibridó con sonda de biotina (3 µM) en una mezcla de hibridación (NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 20 mM (pH 6,7), 10* Denhardtts) incubando la transferencia durante 4 horas a 50°C. Después de hibridación, la transferencia se lavó dos veces durante 5 minutos a 50°C con NaCl 450 mM, citrato de sodio 45 mM, pH 6,4 (2* SSPE) y solución al 1% de dodecilsulfato de sodio (SDS) y una vez durante 10 minutos con Na₂HPO₄ 20 mM, pH 7,4, NaCl 360 mM, EDTA 2 mM y SDS al 0,1% a temperatura ambiente. Posteriormente, la transferencia se incubó durante 30 minutos con 2 µL de solución de estreptavidina/peroxidasa de rábano silvestre (500 U/mL del kit de detección de quimioluminiscencia mejorado de Amersham Life Science) en 10 mL de Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 900 mM, EDTA 5 mM, pH 7,4 y SDS al 0,5%. Después de lavar respectivamente dos veces durante 5 minutos en 2*SSPE, SDS al 0,1% y una vez durante 10 minutos en 2*SSPE a temperatura ambiente, la transferencia se secó entre tejidos, se desarrolló y se expuso a una película de acuerdo con el protocolo del kit de Amersham.

B. Hibridación con sondas por electroquimioluminiscencia (ECL).

Los productos de amplificación se diluyeron dos veces en un diluyente de detección (Tris-HCl 1,0 mM, pH 8,5 y 0,2 g/L de 2-metilisotiazolona.HCl). Posteriormente, 5 µL del producto de amplificación diluido se incubaron durante 30 minutos a 41°C con 0,084 µM de la sonda de biotina específica para el VIH-1 unida a 5 µg de perlas magnéticas revestidas de estreptavidina (tamaño medio 2,8 µm ± 0,2 µm, Dynal, Great Neck, NY, USA) y 2*10¹¹ moléculas de una sonda marcada con (complejo de Tris[2,2-bipiridina]rutenio[II]) para ECL, en un volumen total de 25 µL de NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM, pH 6,4 (5* SSC). Como controles negativos, se incubó también un diluyente de detección con las mezclas de sonda en forma de perlas y sonda para ECL. Durante la incubación, se agitaron los tubos cada 10 minutos para mantener las perlas en suspensión. Posteriormente, se añadieron 300 µL de solución de tampón de ensayo (tripropilamina 100 mM, pH 7,5) y los tubos se colocaron en un instrumento para detección por ECL (NASBA QR-system de Organon Teknika BV) para leer las señales emitidas por ECL.

Ejemplo 2: Amplificación y detección del RNA genómico del VIH-1.

Se analizaron los siguientes pares de cebadores en 10^4 copias (determinadas por espectrofotometría a 260 nm) del patrón de RNA del VIH-1. El RNA se añadió directamente en la amplificación. El análisis de los productos amplificados se realizó por electroforesis en gel como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 1.

5 Todos los pares de cebadores y las sondas de la presente invención podían amplificar y detectar el RNA del VIH-1 a partir del subtipo B en un grado similar. Se muestra la sensibilidad analítica para dos pares de cebadores (SEQ ID 9/SEQ ID 5 y SEQ ID 11/SEQ ID 5) usando una serie de diluciones del patrón de RNA del VIH-1 que tiene una concentración inicial de $5,5 \times 10^9$ copias/mL. La detección se realizó con sondas que tenían las secuencias representadas en SEQ ID 7 y SEQ ID 6. La amplificación y la detección se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 1. La Tabla

10 1 muestra los resultados obtenidos con ambos pares de cebadores.

Tabla 1

Copias del RNA del VIH-1	SEQ ID 3-SEQ ID 5		SEQ ID 9-SEQ ID 5	
	Nº detectadas	% detectadas	Nº detectadas	% detectadas
200	4:8	100%	4:4	100%
100	8:8	100%	8:8	100%
50	8:8	100%	8:8	100%
25	7:8	87,5%	7:8	87,5%
12	6:8	75%	4:8	50%
6	2:8	25%	4:7	57%
3	0:8	0%	2:7	28,5%
0	0:8	0%	0:7	0%

Ambos pares de cebadores tienen aproximadamente la misma sensibilidad para el patrón de RNA del VIH-1 respectivamente, un porcentaje de detección del 70% para el par de cebadores SEQ ID 9/SEQ ID 5 y un porcentaje de

15 detección del 63% para el par de cebadores SEQ ID 3/SEQ ID 5.

Ejemplo 3: Amplificación y detección del RNA del VIH-1 en presencia de un control interno.

En este ejemplo, se analizaron el par de cebadores SEQ ID 9/SEQ ID 5 y la sonda con la secuencia SEQ ID 7 en series de diluciones del patrón de RNA del VIH-1 en presencia de un control interno (ic)-RNA. El ic-RNA es una transcripción *in vitro* que contiene parte de la secuencia LTR del VIH-1 HXB-2 y se añaden 10^4 copias (determinadas por espectrofotometría a 260 nm) antes del aislamiento de los ácidos nucleicos. El aislamiento, la amplificación y la

20 detección por ECL se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 1. Como comparación, se realizaron una amplificación y una detección separadas usando un par de cebadores localizado en la región *gag* del VIH-1 (P1/P2) anteriormente descrita por Van Gemen et al., 1993, *Journal of Virological Methods* 43, 177-188. Las sondas usadas para detectar los productos de amplificación generados por el par de cebadores basado en la región *gag* fueron:

25 Sonda de biotina: 5'-TGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGA.
Sonda para ECL: 5'-GAATGGGATAGAGTGCATCCAGTG.

Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Copias del RNA del VIH-1/200 µL	SEQ ID 9-SEQ ID 5 de LTR		GAG P1/P2	
	Nº detectadas	% detectadas	Nº detectadas	% detectadas
320	9:10	90%	na*	na*
160	5:10	50%	8:10	80%
80	5:10	50%	5:10	50%
40	3:8	38%	4:10	40%
20	3:10	32%	1:10	10%
10	1:10	10%	2:10	20%
0	0:5	0%	1:5	20%

na* = no analizada.

30 Tanto el par de cebadores para LTR de este ejemplo como el par de cebadores para *gag* eran capaces de detectar una cantidad similar de RNA del VIH-1 en un ensayo controlado por un RNA producido *in vitro* que se añadió antes del aislamiento de los ácidos nucleicos.

Ejemplo 4: Detección del RNA del VIH-1 en muestras positivas al VIH-1.

En este ejemplo, se analizaron 40 muestras positivas al VIH-1 procedentes de diversas regiones geográficas para detectar la presencia del RNA del VIH-1. Todas las muestras se aislaron por el método de aislamiento de ácidos nucleicos descrito en el Ejemplo 1. La amplificación y detección se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 1 usando el par de cebadores SEQ ID 9/SEQ ID 5 y la sonda con la secuencia SEQ ID 7 o la sonda con la secuencia SEQ ID 8.

Para comparación, se realizaron una amplificación y una detección separadas usando el par de cebadores para *gag* y las sondas descritas en el Ejemplo 3. La presencia de productos amplificados se detectó por hibridación con sonda para ECL de acuerdo con el método del Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Par de cebadores	Sonda para ECL	Nº detectadas	% detectadas
SEQ ID 9/SEQ ID 5 (LTR)	SEQ ID 7	40/40	100%
SEQ ID 9/SEQ ID 5 (LTR)	SEQ ID 8	10/10	100%
P1/P2		29/40	72,5%

Ambas combinaciones de cebador y sonda derivadas de la región LTR del VIH-1 descritas en este ejemplo fueron capaces de detectar el VIH-1 de todas las muestras analizadas. Por el contrario, la combinación cebador y sonda del ensayo con *gag* no pudo detectar el RNA genómico del VIH-1 en un gran número de muestras.

Ejemplo 5: Amplificación y detección del RNA del VIH-1 con subtipos definidos.

En este ejemplo, se analizaron 33 muestras que contenían RNA del VIH-1 de subtipos conocidos basados en la envoltura. Las muestras procedentes de virus subtipados se propagaron en cultivos celulares. Muestras de los líquidos sobrenadantes de los cultivos celulares tanto de variantes del grupo M subtipos A a H como de variantes del grupo O se añadieron a plasma humano negativo al VIH-1 y se trataron de acuerdo con el método del Ejemplo 1. La amplificación y detección se realizaron esencialmente como en el Ejemplo 4.

Los resultados se muestran en la Tabla 4 como el número de muestras de cada tipo a partir de las cuales se detectó el RNA del VIH-1 del número total de cada tipo analizado.

Tabla 4

Par de cebadores	Tipos de VIH-1									Total
	A	B	C	D	E	F	G	H	O	
SEQ ID 9/SEQ ID 5 (LTR)	5:5	2:2	2:2	5:5	7:7	1:1	1:1	1:1	9:9	33:33
	4:5	2:2	2:2	5:5	6:7	1:1	1:1	1:1	0:9	33:33

Se detectó el RNA del VIH-1 de las 33 muestras de VIH-1 usando el par de cebadores para LTR SEQ ID 9/SEQ ID 5 y la sonda con la secuencia SEQ ID 7. Por el contrario, el ensayo que utilizó la combinación de cebadores y sondas para *gag* como se ha descrito en el Ejemplo 3 no pudo detectar el subtipo A ni el subtipo E de cada una de las muestras y de todas las muestras que contenían RNA del VIH-1 de los miembros del grupo O.

Ejemplo 6: Amplificación y detección de las muestras clínicas con VIH-1.

En este ejemplo, se analizaron 7 muestras obtenidas de pacientes seropositivos originarios de África, Sudamérica y Asia para detectar la presencia del RNA genómico del VIH-1. A pesar del hecho de que las muestras de sangre de estos pacientes eran positivas tanto al anticuerpo anti-p24 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) como a la transferencia Western (Genelabs), todas las muestras se clasificaron como negativas por el ensayo NASBA HIV-1 RNA QL (Organon Teknika BV) que usó la combinación de par de cebadores y sonda para *gag* del Ejemplo 3 y solo una única muestra (R9612222) se detectó y cuantificó (29.500 copias de RNA/mL) por el ensayo Quantiplex HIV-1 RNA 2.0 (Chiron) usando un volumen de muestra de 50 µL. Por el contrario, usando un volumen de muestra igual, el par de cebadores SEQ ID 9/SEQ ID 5 y la sonda con la secuencia SEQ ID 7 detectaron cuatro de siete muestras (Tabla 5).

Tabla 5

Código de la muestra	País	SEQ ID 9/SEQ ID 5 (LTR)
R9610155	Tailandia	positiva
R9612222	Ghana	positiva
R9700062	Brasil	negativa
R9612218	Zaire	negativa
R9611710	Liberia	positiva
R9610718	Antillas	positiva
R9607884	Ruanda	negativa

Las muestras que fallaron por la combinación de cebador y sonda para LTR no se detectaron debido a una baja carga viral por debajo del nivel de detección, puesto que usando un volumen de muestra de 1 mL el ensayo Quantiplex HIV-1 RNA 2.0 (Chiron) cuantificó niveles de RNA del VIH-1 de 30 o inferiores a 30 copias de RNA de VIH-1 por 50 µL de estas muestras.

5

REIVINDICACIONES

1. Par de oligonucleótidos, para uso como un conjunto de cebadores en la amplificación de una secuencia diana situada dentro de la región LTR del genoma de VIH-1, consistiendo dicho par en un primer oligonucleótido que tiene una longitud de 26-50 nucleótidos y que comprende la secuencia:

5 SEQ ID 1: G GGC GCC ACT GCT AGA GA

y un segundo oligonucleótido que tiene una longitud de 15-26 nucleótidos y que comprende al menos un fragmento de 10 nucleótidos de la secuencia:

SEQ ID 4: CTG CTT AAA GCC TCA ATA AA

10 en donde el primer oligonucleótido está provisto de una secuencia de promotor reconocida por una RNA-polimerasa dependiente de DNA y la amplificación es una amplificación basada en la transcripción.

2. Método para la detección de ácido nucleico del VIH-1 en una muestra, en la que la muestra se somete a una reacción de amplificación de ácidos nucleicos basada en la transcripción usando un par de oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1 y reactivos de amplificación adecuados, y se detecta la presencia de cualquier ácido nucleico amplificado.

15 3. Método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la detección de cualquier ácido nucleico amplificado se realiza haciendo reaccionar la muestra con un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

SEQ ID 6: TCT GGT AAC TAG AGA TCC CTC

SEQ ID 7: TAG TGT GTG CCC GTC TGT

SEQ ID 8: AGT GTG TGC CCG TCT GTT,

20 que está provisto de un marcador detectable, en condiciones de hibridación adecuadas, y detectando la presencia del marcador en cualquiera de los híbridos formados entre la secuencia amplificada y la sonda.

4. Kit de ensayo para la detección de VIH-1 en una muestra que comprende:

- un par de oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1,
- un oligonucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos sustancialmente complementaria de
- 25 al menos parte de la secuencia de ácidos nucleicos amplificada, provisto de un marcador detectable y
- reactivos de amplificación adecuados.

5. Uso de un par de oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1, como un conjunto de cebadores en la amplificación de una secuencia diana situada dentro de la región LTR del genoma del VIH-1.

Productos de amplificación después de transferencia y detección por
quimioluminiscencia mejorada

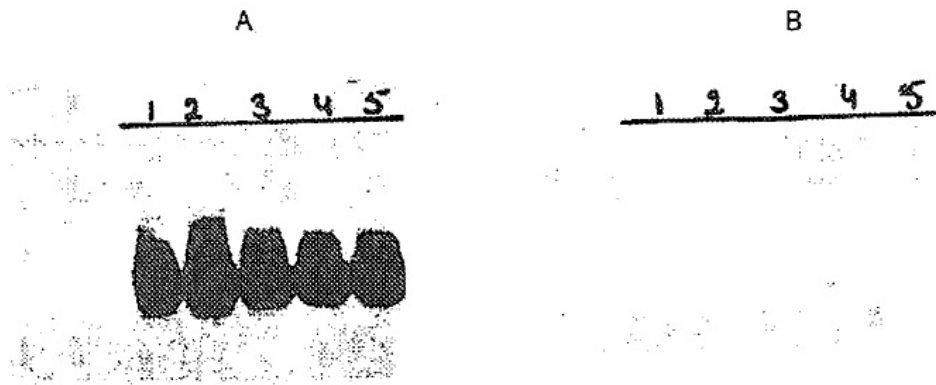


FIGURA 1