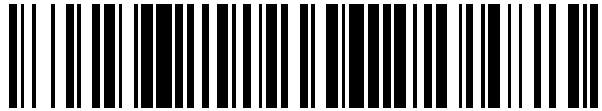


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 495**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.1998 E 09156276 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 2067868**

54 Título: **Cebadores de ácido nucleico y sondas para detectar VIH-1 y VIH-2**

30 Prioridad:

**16.06.1997 US 876546**

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

**03.03.2014**

73 Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)  
1300 E. Touhy Avenue  
Des Plaines Illinois 60018, US**

72 Inventor/es:

**KROEGER, PAUL E.;  
ABRAVAYA, KLARA;  
ESPING, CLAUDIA A.;  
GORZOWSKI, JACEK J.;  
HOENLE, ROBERT y  
MOORE, JENNIFER J.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 445 495 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

Cebadores de ácido nucleico y sondas para detectar VIH-1 y VIH-2

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a oligonucleótidos y a procedimientos para detectar el VIH-1.

10 **Antecedentes de la invención**

15 Los virus clasificados como VIH contienen ARN como información genética y la infectividad del VIH depende de la capacidad del virus para insertar su información genética en el ADN de un huésped. Con el fin de insertar su información genética y, por consiguiente, de infectar con éxito a un huésped, un virus VIH debe convertir su material genético (ARN) en ADN de modo que la información genética del VIH sea compatible con la del huésped. Aparentemente, el VIH tiene éxito en la conversión de su ARN en ADN, dada la prevalencia del SIDA. No obstante, aunque el virus puede convertir con éxito el ARN en ADN, la conversión apenas es precisa. En otras palabras, la copia en ADN del ARN viral no siempre es exacta y la copia en ADN puede diferir del ARN viral en varios pares de bases. Por tanto, aunque inicialmente un huésped puede estar infectado con una única partícula de virus, tras varias rondas de replicación el huésped puede estar infectado con una población genéticamente diversa de virus.

20 Aunque el VIH no se ha clasificado de forma uniforme, generalmente está aceptado que el VIH-1 y el VIH-2 son virus diferentes. Dentro de cada una de estas clasificaciones de virus hay varios grupos o subtipos. Por ejemplo, dentro de la clasificación del VIH-1 existe el "grupo M", que también se clasifica en los subtipos A-F, y el "grupo O". Por otro lado, el VIH-2 contiene los subtipos A-E. Los subtipos del VIH-1 y el VIH-2 se dividen todavía más en categorías demasiado numerosas como para mencionarlas en este contexto. No obstante, cabe mencionar que estas divisiones se basan en la variación genética entre los virus y, de acuerdo con la teoría taxonómica, muchos de estos virus son la progenie de un único virus. Por consiguiente, los numerosos tipos y subtipos de VIH demuestran la naturaleza altamente mutable del VIH y la variabilidad genética del genoma del VIH.

30 La variabilidad genética de los virus se puede atribuir a la ineficiencia con la que el virus convierte su ARN en ADN, como se ha mencionado anteriormente. Otra teoría concerniente a la variabilidad genética de los virus es que los huéspedes pueden estar infectados con diferentes poblaciones de VIH (que, como se ha mencionado anteriormente, puede surgir por una infección producida por un único virus) y mediante el curso de la replicación y el empaquetamiento de la información genética viral, pedazos de un genoma viral se pueden recombinar con pedazos de otro genoma viral. Por consiguiente, tras el empaquetamiento del genoma recombinado se forma un virus genéticamente distinto. Con independencia del modo por el cual el virus muta, está claro que los virus conocidos como VIH tienen genomas altamente mutables y, por consiguiente, están en constante cambio. Esto hace que aquéllos que buscan procedimientos de detección de virus en función de su información genética se enfrenten con un objetivo en constante movimiento.

40 Aunque se sabe que determinadas regiones del genoma del VIH están conservadas, esto no significa que estas regiones son inmunes a mutaciones, en particular si las mutaciones en estas regiones no afectan a la estructura de una proteína codificada por estas regiones. Por consiguiente, el desarrollo de reactivos y procedimientos para detectar VIH en base a su información genética supone un reto continuo.

45 El documento EP 0727497 A divulga cebadores para la amplificación por PCR de una secuencia de ácido nucleico a partir del gen *pol* del VIH de tipo 1 humano y sondas para la detección del ácido nucleico amplificado usaron dichos cebadores.

50 En Respass, R.A. y col., "Detection of genetically diverse human immunodeficiency virus type 1 group M and O isolates by PCR", Journal of Clinical Microbiology, vol. 35, nº 5, 1997, páginas 1284-1286, se describe la detección de aislados de grupos M y O del VIH-1 mediante un ensayo AMPLICOR HTV-1 de Roche y un sistema de cebadores/sondas.

55 El documento EP 0617132 A proporciona oligonucleótidos para amplificación y sondas de ensayo para hibridación para distinguir el VIH-1 humano de otros virus que se encuentran en tejidos sanguíneos humanos.

60 Gingeras T.R. y col., "Use of self-sustained sequence replication amplification reaction to analyze and detect mutations in zidovudine-resistant human immunodeficiency virus", The Journal of Infectious Diseases, vol. 164, nº 6, 1991, páginas 1066-1076 está dirigido a la determinación del genotipo del gen *pol* mutado del VIH-1 humano usando la replicación de secuencia autosostenida (3SR) e hibridación diferencial de tipo sándwich con esferas (BBSH) en aislados de VIH-1 resistentes a zidovudina.

65 El documento EP 0404625 se refiere a secuencias de oligonucleótidos derivados del genoma del virus VIH-2 ROD y del virus VIS-mac 142 y a su uso en un procedimiento *in vitro* para el diagnóstico de la infección de un individuo por un virus de tipo VIH-2.

En el documento WO 93/13223 se describen secuencias de sondas de ADN para la detección de un VIH en una muestra en un ensayo de hibridación de tipo sándwich en fase de solución. Además, se ilustran ensayos de hibridación de ácido nucleico amplificado usando las sondas.

5 El documento US 5629153 divulga una construcción de polidesoxinucleótido para usar junto con una ARN polimerasa dependiente de ADN, como amplificador de señal en ensayos de hibridación de ácido nucleico. También se divulga un procedimiento de uso de esta construcción en ensayos de hibridación. El procedimiento implica la formación de un complejo de hibridación que comprende la construcción y la secuencia diana, la adición de una polimerasa específica del promotor en la construcción y la cuantificación del transcrito de ARN resultante.

10 En el documento FR 2652091 se divulgan secuencias de nucleótidos derivadas de los genomas de virus de los tipos VIH-1 o VIH-2 o virus del tipo VIS, así como su aplicación como cebadores oligonucleotídicos para el diagnóstico *in vitro* de la infección de un individuo con un virus de los tipos VIH-1 y/o VIH-2.

15 Carman, W.F. y col., "Detection of enzymatically amplified human immunodeficiency virus DNA by oligonucleotide solution hybridization and by incorporation of radiolabeled deoxynucleotides", Journal of Clinical Microbiology, vol. 27, nº 11, Noviembre de 1989, páginas 2570-2573 describen dos procedimientos para detectar *in vitro* ADN del virus VIH amplificado enzimáticamente con sensibilidad mejorada con respecto a la tinción con bromuro de etidio. El primer procedimiento hace referencia a una hibridación en solución de oligonucleótidos marcados con productos amplificados. El segundo procedimiento implica la incorporación de desoxinucleótidos radiomarcados en la cadena de ADN en elongación.

20 Los documentos WO 94/03635 and US 5569582 divulgan procedimientos, cebadores, sondas y kits para la rápida amplificación y detección de ácidos nucleicos, en particular del genoma del VIH-1. También se proporciona un procedimiento mejorado para amplificar cantidades pequeñas de ácido nucleico en una muestra en la que las etapas de amplificación se realizan a la misma temperatura o, como alternativa, a dos temperaturas diferentes. También se proporcionan procedimientos para detectar el ácido nucleico amplificado en los que la señal de detección se refuerza, así como sondas y kits de ensayo relacionados.

30 En Brown V. y col., "Detection of HIV-1 and -2 infection by the polymerase chain reaction (PCR)", Resumen de la reunión general de la Sociedad Americana de Microbiología, vol. 91, nº 0, 1991, página 335, se divulga la necesidad del uso de múltiples pares de cebadores para maximizar la detección de infección por VIH-1 y por VIH-2, ya que la mayoría de los pares de cebadores específicos del VIH-2 analizados en este estudio eran capaces de detectar muchas, aunque no todas, muestras de pacientes seropositivos para el VIH-2.

35 El documento WO 97/07235 divulga un procedimiento para detectar una secuencia de ácido nucleico diana usando amplificación de ácido nucleico, donde las sondas de hibridación para la detección de la secuencia diana amplificada están presentes durante la reacción de amplificación.

#### 40 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un conjunto de cebador/sonda para detectar los subtipos A-F del VIH-1 que consisten en el conjunto 1 de cebador/sonda (SEC ID N° 5, 6 y 7).

45 La presente invención proporciona además un procedimiento de detección de los subtipos A-F del VIH-1 en una muestra de ensayo, que comprende las etapas de (a) formar una mezcla de reacción que comprende reactivos de amplificación de ácido nucleico, el conjunto 2 de cebador/sonda (SEC ID N° 5, 6 y 7) y una muestra de ensayo que contiene una secuencia diana del VIH; (b) someter la mezcla a condiciones de amplificación para generar al menos una copia de una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a la secuencia diana; (c) hibridar la sonda con la secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana para formar un híbrido que comprenda la sonda y la secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana y (d) detectar el híbrido como una indicación de la presencia del VIH en la muestra.

55 El formato de RT-PCR preferido comprenderá las mismas etapas que se han mencionado anteriormente, pero los reactivos de amplificación comprenderán una enzima que tiene actividad de transcriptasa inversa. Además, de acuerdo con cualquiera de los procedimientos proporcionado en el presente documento, la etapa (b) se puede repetir muchas veces, preferentemente entre 10 y 100 veces, para aumentar el número de copias de la secuencia diana. Los expertos en la técnica entienden que la etapa (b) se puede repetir mediante ciclado térmico de la mezcla de reacción.

60 En una realización preferida, los reactivos de amplificación incluyen una enzima que tiene actividad de transcriptasa inversa y el procedimiento comprende además la etapa, Después de la etapa (a) y antes de la etapa (b), de formar un ADNc a partir de un genoma del VIH.

65 La presente invención también proporciona un kit para detectar los subtipos A-F del VIH-1 que comprende el conjunto 2 de cebador/sonda (SEC ID N° 5, 6 y 7) y reactivos de amplificación, preferentemente en los que los

reactivos de amplificación comprenden una enzima que tiene actividad de transcriptasa inversa.

**Descripción detallada de la invención**

5 Como se ha divulgado anteriormente, el procedimiento y el kit de la invención usan el conjunto 2 de cebador/sonda (SEC ID N° 5, 6 y 7) para detectar los subtipos A-F del VIH-1. Los conjuntos de cebador/sonda distintos al conjunto 2 de cebador/sonda no forman parte de la invención y se divulgan en el presente documento a efectos comparativos.

10 Los conjuntos de cebador/sonda proporcionados en el presente documento comprenden dos cebadores y al menos una sonda. Estos conjuntos de cebador/sonda se pueden usar de acuerdo con técnicas de amplificación de ácido nucleico. Por tanto, los cebadores de cualquier conjunto de cebador/sonda concreto se pueden usar para amplificar una secuencia diana. En la mayoría de los casos, la sonda hibrida con las copias de la secuencia diana que se generan mediante uno de los cebadores y, generalmente, facilita la detección de cualquiera de las copias de la secuencia diana generada durante el curso de la reacción de amplificación. Todos los conjuntos de cebador/sonda se pueden usar de acuerdo con procedimientos de amplificación de ácido nucleico para detectar de forma específica y sensible el grupo M y el grupo O del VIH-1, así como los diversos subtipos del VIH-2. Los conjuntos de cebador/sonda para detectar los subtipos de VIH-1 se presentan a continuación en la Tabla 1 y los conjuntos de cebador/sonda para detectar los subtipos del VIH-2 se presentan en la Tabla 2 a continuación.

20

TABLA 1

Conjunto de cebador/sonda	Secuencia (5'-3')	SEC ID N°
1	ATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGT	2
	CCTGCACTGTACCCCCAATCC	3
	ACAGCAGTACAAATGGCA	4
2	GGAGCAGAACTTTCTATGTAGATGG	5
	CATATTGTGAGTCTGTTACTATGTTTACT	6
	TAGGAAAAGCAGGATATG	7
3	GGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGT	8
	GGCCATTGTTAACTTTTGGCCATCCA	9
	ATTAGTCCTATTGAACTGT	10
4	ATAAGCCCCATAGCC	11
	CCTAGTATAACAATGAGACACCAGG	12
	GATCCTACATACAAGTCATCCATGTA	13
	GGATGGAAAGGATCACCA	14

TABLA 2

Conjunto de cebador/sonda	Secuencia (5'-3')	SEC ID N°
5	ACTGATGGCAGTTCATTGCATGAATTTAAAAG	16
	TTCCACAGCTGATCTCTGCCTTCTCTG	17
	CAGAACAAGAAATACAATTC	18
6	CCTCAATTCTCTCTTTGGAAAAGACC	19
	AAATGTTGATTGGGGTATCTCCTGTC	20
	CCAAAAATAGTAGGGGG	21
7	ATAGTAGCAGGAATAGA	22
	CAATAGTAGCAGGAATAGAGTTAGG	23
	AAATGTTGATTGGGGTATCTCCTGTC	20
	CCAAAAATAGTAGGGGG	21
8	ACTGATGGCAGTTCATTGCATGAATTTAAAAG	16
	CACAGCTGATCTCTGCCTTCTCTGTAATAGAC	24
	CAGAACAAGAAATACAATTC	18

Como se ha citado anteriormente, los cebadores incluidos en los conjuntos de cebador/sonda se pueden usar para cebar la síntesis de copias de una secuencia diana de VIH-1 en el caso de las SEC ID N° 2, 3, 5, 6, 8, 9, 12 y 13; y copias de una secuencia diana de VIH-2 en el caso de las SEC ID N° 16, 17, 19, 20, 23 y 24. El resto de las SEC ID N° (SEC ID N° 4, 7, 10, 11, 14, 18, 21 y 22) hibrida con los productos de amplificación de cualquiera o ambas secuencias del cebador halladas en el mismo conjunto de cebador/sonda. Por ejemplo, el conjunto 6 de cebador/sonda es específico del VIH-2 en cuanto a que las SEC ID N° 19 y 20 ceban la síntesis de la secuencia diana del VIH-2 y las SEC ID N° 21 y 22 hibridan con los productos de amplificación producidos por las SEC ID N° 19 y 20. Por tanto, las secuencias de la sonda también son específicas de los diversos subtipos de VIH-1 y VIH-2.

Generalmente, las secuencias de los cebadores comprenden ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). Por otro lado, las secuencias de las sondas pueden comprender ADN, ARN o análogos de ácidos nucleicos tales como análogos de ácidos nucleicos sin cargar, incluidos, entre otros, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), que se divulgan en la solicitud de patente internacional WO 92/20702, o análogos de morfolino, que se describen en las patentes de EE.UU. números 5.185.444, 5.034.506 y 5.142.047, todos ellos incorporados en el presente documento por referencia. Dichas secuencias se pueden sintetizar de forma rutinaria usando varias técnicas disponibles en la actualidad. Por ejemplo, se puede sintetizar una secuencia de ADN usando técnicas químicas convencionales del nucleótido fosforoamidita y los instrumentos disponibles en Applied Biosystems, Inc, (Foster City, CA); DuPont, (Wilmington, DE); o Milligen, (Bedford, MA). De un modo similar, y cuando sea deseable, las secuencias se pueden marcar usando metodologías bien conocidas en la técnica, tales como las descritas en las solicitudes de patente de EE.UU. números 5.464.746; 5.424.414 y 4.948.882, todas ellas incorporadas en el presente documento por referencia.

El término "marcador", como se usa en el presente documento, quiere decir una molécula o resto que tiene una propiedad o característica que es capaz de detectar. Un marcador se puede detectar directamente como con, por ejemplo, radioisótopos, fluoróforos, quimioluminóforos, enzimas, partículas coloidales, micropartículas fluorescentes y similares; o un marcador puede ser detectable indirectamente, como con, por ejemplo, miembros de unión específica. Se entenderá que los marcadores de detección directa pueden requerir componentes adicionales, tales como sustratos, sustratos, reactivos desencadenantes, luz y similares para permitir la detección del marcador. Cuando se usan marcadores de detección indirecta, normalmente se usan en combinación con un "conjugado". Habitualmente, un conjugado es un miembro de unión específica que se ha unido o acoplado a un marcador de detección directa. Las sustancias químicas de acoplamiento para sintetizar un conjugado se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, cualquier medio químico y/o medio físico que no destruye la propiedad de unión específica del miembro de unión específica o la propiedad de ser detectable del marcador. Como se usa en el presente documento, "miembro de unión específica" significa un miembro de un par de unión, es decir dos moléculas diferentes en las que una de las moléculas, mediante, por ejemplo, medios químicos o físicos, se une de forma específica a la otra molécula. Además de los pares de unión específica de antígeno y anticuerpo, otros pares de unión específica incluyen, entre otros, avidina y biotina; haptenos y anticuerpos específicos de haptenos; secuencias nucleotídicas complementarias; cofactores o sustratos enzimáticos y enzimas; y similares.

La expresión "muestra de ensayo", como se usa en el presente documento, significa cualquiera de la que se sospecha que contiene una secuencia diana del VIH. La muestra de ensayo es, o puede derivar de, cualquier fuente biológica, tal como, por ejemplo, sangre, fluido ocular del cristalino, líquido cefalorraquídeo, leche, fluido ascítico, líquido sinovial, fluido peritoneal, líquido amniótico, tejido, caldos de fermentación, cultivos celulares y similares. La muestra de ensayo se puede usar (i) directamente tal como se obtiene de la fuente o (ii) tras un pretratamiento para modificar la naturaleza de la muestra. Por tanto, la muestra de ensayo se puede pretratar antes de, por ejemplo, preparando plasma de sangre, rompiendo células o partículas víricas, preparando líquidos a partir de materiales sólidos, diluyendo fluidos viscosos, filtrando líquidos, destilando líquidos, concentrando líquidos, inactivando componentes de interferencia, añadiendo reactivos, purificando ácidos nucleicos y similares.

Una "secuencia diana", como se usa en el presente documento, significa una secuencia de ácido nucleico que se detecta, amplifica o se amplifica y se detecta usando los conjuntos de cebador/sonda proporcionados en el presente documento. Adicionalmente, aunque en ocasiones la expresión secuencia diana hace referencia a una sola cadena, los expertos en la técnica reconocerán que, en realidad, la secuencia diana puede ser bicatenaria. Por tanto, en los casos en los que la diana es bicatenaria, las secuencias del cebador de la presente invención amplificarán ambas hebras de la secuencia diana.

Como se ha mencionado anteriormente, las secuencias del cebador de cualquier conjunto de cebador/sonda (por sí mismas o con oligonucleótidos adicionales) se pueden usar como cebadores de amplificación de acuerdo con procedimientos de amplificación bien conocidos en la técnica. Dichas reacciones incluyen, entre otras, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita en las patentes de EE.UU. 4.683.195 y 4.683.202, la reacción en cadena de la ligasa (LCR) descrita en el documento EP-A-320 308 y la LCR con espacio (GLCR) descrita en la patente de EE.UU. N° 5.427.930, todas ellas incorporadas en el presente documento por referencia. Genéricamente, estos ejemplos de reacciones de amplificación generan múltiples copias de una secuencia diana de ADN.

De acuerdo con la presente invención, la secuencia diana puede, de hecho, ser ADN; por otro lado, a la luz de la naturaleza de tipo ARN del genoma del VIH, los conjuntos de cebador/sonda pueden usarse de acuerdo con un

formato de "RT-PCR" que se describe en las patentes de EE.UU. números 5.322.770 y 5.310.652, todas ellas incorporadas en el presente documento por referencia. En resumen, el formato de RT-PCR proporciona un procedimiento de transcripción de una hebra de ADN a partir de una secuencia diana de ARN. La hebra de ADN copiada transcrita a partir del ARN diana se denomina, normalmente, "ADNc", que puede servir como molde para la amplificación mediante cualquiera de los procedimientos mencionados con anterioridad. El procedimiento de generar ADNc comparte muchos de los principios de hibridación y extensión que rodean a otros procedimientos de amplificación tales como PCR, pero la enzima usada deberá tener actividad de transcriptasa inversa. Las enzimas que tienen actividad de transcriptasa inversa, así como el procedimiento de RT-PCR, son bien conocidas en la técnica y, por tanto, no precisan discusión adicional. Adicionalmente, también se conocen otros procedimientos para la síntesis de ADNc e incluyen la solicitud de patente de EE.UU. de propiedad común con número de serie 08/356.287 presentada el 22 de febrero de 1995, que se incorpora en el presente documento por referencia.

De acuerdo con una realización preferida, los conjuntos de cebador/sonda se usan en la reacción de amplificación "PCR de hibridación con oligonucleótidos" (en el presente documento denominada de forma variable "PH PCR", como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N° de serie 08/514,704, presentada el 14 de agosto de 1995, incorporada en el presente documento por referencia. En resumen, los reactivos usados en el presente procedimiento comprenden al menos un conjunto de cebador/sonda (denominado en el presente documento conjuntos 1-8 de cebador/sonda), así como otros reactivos para realizar una reacción de amplificación. "Otros reactivos para realizar una reacción de amplificación" o "reactivos de amplificación de ácido nucleico" incluyen reactivos que son bien conocidos y pueden incluir, entre otros, una enzima que tiene actividad polimerasa, cofactores enzimáticos tales como magnesio; sales; dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) y desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP) tales como, por ejemplo, desoxiadenina trifosfato, desoxiguanina trifosfato, desoxicitosina trifosfato y desoxitimina trifosfato.

Generalmente, el procedimiento preferido comprende las etapas de (a) formar una mezcla de reacción que comprende reactivos de amplificación de ácidos nucleicos, al menos un conjunto de cebador/sonda de la presente invención y una muestra de ensayo que se sospecha que contiene una secuencia diana; (b) someter la mezcla a condiciones de amplificación para generar al menos una copia de una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana; (c) hibridar la sonda con la secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana para formar un híbrido que comprende la sonda y la secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana y (d) la detectar el híbrido como una indicación de la presencia de la secuencia diana (VIH) en la muestra. Se entenderá que la etapa (b) del procedimiento anterior se puede repetir varias veces antes de la etapa (c) mediante ciclación térmica de la mezcla de reacción entre 10 y 100 veces, más normalmente entre 20 y 60 veces, como se conoce bien en la técnica.

Las condiciones de amplificación generalmente se definen como las condiciones que estimulan el apareamiento y la extensión de una o más secuencias de ácido nucleico. En la técnica se conoce bien que dicho apareamiento depende de un modo más bien predecible de diversos parámetros, incluidos la temperatura, la fuerza iónica, la longitud de secuencia, la complementariedad y el contenido en G:C de las secuencias. Por ejemplo, reducir la temperatura en el medio de las secuencias complementarias de ácido nucleico estimula el apareamiento. Para cualquier conjunto de secuencias dado se puede estimar la temperatura de fusión, o  $T_m$ , mediante cualquiera de los diversos procedimientos conocidos. Normalmente, las aplicaciones diagnósticas usan temperaturas de hibridación cercanas a (es decir, dentro del 10 °C) la temperatura de fusión. La fuerza iónica o concentración de "sales" también afecta a la temperatura de fusión, ya que los cationes pequeños tienden a estabilizar la formación de dúplex anulando la carga negativa sobre la estructura de fosfodiéster. Las concentraciones típicas de sales dependen de la naturaleza y la valencia de los cationes pero son fácilmente entendidas por los expertos en la técnica. De un modo similar, un contenido elevado de apareamientos G:C implican 3 enlaces de hidrógeno en los que los pares A:T solo tienen dos y porque las secuencias más largas tienen más enlaces de hidrógeno uniendo las secuencias. Por tanto, un contenido elevado de G:C y secuencias de longitudes mayores afectan a las condiciones de hibridación al elevar la temperatura de fusión.

Una vez que se seleccionan las secuencias para una aplicación diagnóstica dada, el contenido en G:C y la longitud se conocerán y podrán usarse para determinar con precisión qué condiciones de hibridación abarcan. Dado que normalmente la fuerza iónica se optimiza para la actividad enzimática, el único parámetro que queda por variar es la temperatura. En general, se selecciona la temperatura de hibridación cercana a la  $T_m$  de los cebadores o la sonda o la misma. Por tanto, la obtención de condiciones de hibridación adecuadas para un conjunto de cebadores/sondas concreto está dentro de la experiencia de aquel que pone en práctica la técnica.

De acuerdo con el procedimiento OH PCR, es preferible seleccionar cebadores, sondas y condiciones de reacción de un modo tal que la secuencia de la sonda tiene una temperatura de fusión menor que las secuencias de los cebadores, de modo que después de introducir la mezcla de reacción en las condiciones de amplificación se producen copias de la secuencia diana o su complementaria (denominada de forma variable ampliación) a una temperatura superior a la  $T_m$  de la sonda. Después de sintetizar dichas copias, se desnaturalizan y la mezcla se enfría para permitir la formación de híbridos entre las sondas y cualquier copia de la diana o su complementaria. La velocidad de reducción de la temperatura desde la temperatura de desnaturalización hasta una temperatura a la que las sondas se unan a copias monocatenarias es, preferentemente, bastante rápida, por ejemplo entre

aproximadamente 8 minutos a aproximadamente 15 minutos, preferentemente en menos de 2 minutos, Dicho enfriamiento rápido favorece a la formación del híbrido entre las copias de la secuencia diana y la sonda en lugar de, por ejemplo, la formación del híbrido entre hebras complementarias del amplicón.

5 En los casos en los que se usan marcadores para detectar los productos de la secuencia del cebador, las secuencias del cebador están marcadas con un marcador de captura o con un marcador de detección. La secuencia de la sonda se usa para hibridar con la secuencia generada por la secuencia del cebador y, normalmente, hibrida con una secuencia que no incluye la secuencia del cebador. De un modo similar a la secuencia del cebador, la secuencia de la sonda también está marcada con un marcador de captura o con un marcador de detección, con le  
10 inconveniente de que cuando el cebador está marcado con un marcador de captura, la sonda está marcada con un marcador de detección y al contrario. Los marcadores de detección tienen la misma definición que los "marcadores" previamente definidos y los "marcadores de captura" normalmente se usan para separar los productos de extensión y las sondas asociadas con cualquiera de estos productos de otros reactantes de amplificación. Los miembros de unión específica (como se ha definido anteriormente) son muy adecuados para este fin. Asimismo, las sondas  
15 usadas de acuerdo con este procedimiento están bloqueadas, preferentemente, en sus extremos 3' de modo que no se extienden en condiciones de hibridación. Los procedimientos para prevenir la extensión de una sonda son bien conocidos y son cuestión de elección para el experto en la técnica. Normalmente, la adición de un grupo fosfato en el extremo 3' de la sonda basta para el fin de bloquear la extensión de la sonda.

20 Después de formar los híbridos secuencia de la copia/sonda, se pueden usar los marcadores diferenciales (es decir, los marcadores de captura y de detección) sobre la secuencia copia y la secuencia de la sonda para separar y detectar dichos híbridos. Preferentemente, la detección se realiza de acuerdo con los protocolos usados por la instrumentación disponible en Abbott LCx® (Abbott Laboratories; Abbott Park, IL).

25 Como se ha tratado anteriormente, la secuencia diana puede ser ADN o la secuencia diana puede estar incluida en el genoma del VIH y, por tanto, la secuencia diana puede estar en forma de ARN. En los casos en los que la secuencia diana es parte del genoma del VIH, es preferible incluir una enzima que tenga actividad de transcriptasa inversa como parte de los denominados reactivos de amplificación de ácidos nucleicos para permitir la producción de ADNc para la posterior amplificación. De acuerdo con esta realización, las secuencias del cebador también sirven  
30 como cebadores para la síntesis de ADNc. Aunque la invención contempla distintas etapas de producción de ADNc y, después, la amplificación y detección de las secuencias de ADNc amplificadas, se entenderá que estos procedimientos pueden tener lugar de forma simultánea en una única mezcla de reacción de amplificación.

De acuerdo con otra realización, el VIH-1 y el VIH-2 se pueden detectar de forma simultánea en una única reacción usando una combinación de dos conjuntos de cebador/sonda (es decir, uno seleccionado de los conjuntos de cebador/sonda específicos del VIH-1 y el otro seleccionado de los conjuntos de cebador/sonda específicos del VIH-2). Por ejemplo, una muestra de ensayo se pudo poner en contacto con los conjuntos 1 y 8 de cebador/sonda junto con reactivos de amplificación, que pueden o no incluir una enzima que tiene actividad de transcriptasa inversa, para  
35 amplificar y detectar la presencia de VIH-1 y VIH-2 en una muestra de ensayo.

40 Los oligonucleótidos de la presente invención también se pueden proporcionar como parte de un kit útil para detectar VIH-1. Los kits comprenden uno o más contenedores adecuados que contienen el conjunto de cebador/sonda de acuerdo con la presente invención, una enzima que tiene actividad polimerasa, desoxinucleótido trifosfatos y, opcionalmente, una enzima que tiene actividad de transcriptasa inversa. Normalmente, al menos una secuencia  
45 porta un marcador, pero la detección es posible sin este.

### **Ejemplos**

50 Los ejemplos siguientes demuestran detección de varios subtipos de VIH-1 y VIH-2 usando los conjuntos de cebador/sonda proporcionados en el presente documento. Estos cebadores y sondas de ADN que comprenden los conjuntos de cebador/sonda se identifican como SECUENCIA ID Nº 2, SECUENCIA ID Nº 3, SECUENCIA ID Nº 4, SECUENCIA ID Nº 5, SECUENCIA ID Nº 6, SECUENCIA ID Nº 7, SECUENCIA ID Nº 8, SECUENCIA ID Nº 9, SECUENCIA ID Nº 10, SECUENCIA ID Nº 11, SECUENCIA ID Nº 12, SECUENCIA ID Nº 13, SECUENCIA ID Nº 14, SECUENCIA ID Nº 16, SECUENCIA ID Nº 17, SECUENCIA ID Nº 18, SECUENCIA ID Nº 19, SECUENCIA ID Nº 20, SECUENCIA ID Nº 21, SECUENCIA ID Nº 22, SECUENCIA ID Nº 23 and SECUENCIA ID Nº 24. SECUENCIA ID Nº 2, SECUENCIA ID Nº 3, SECUENCIA ID Nº 4, SECUENCIA ID Nº 5, SECUENCIA ID Nº 6, SECUENCIA ID Nº 7, SECUENCIA ID Nº 8, SECUENCIA ID Nº 9, SECUENCIA ID Nº 10, SECUENCIA ID Nº 11, SECUENCIA ID Nº 12, SECUENCIA ID Nº 13 y SECUENCIA ID Nº 14 son específicas para el VIH-1. Una secuencia diana representativa del VIH-1 (subtipo B, cepa MN) se designa en el presente documento como SEC ID Nº 1. SECUENCIA ID Nº 16, SECUENCIA ID Nº 17, SECUENCIA ID Nº 18, SECUENCIA ID Nº 19, SECUENCIA ID Nº 20, SECUENCIA ID Nº 21, SECUENCIA ID Nº 22, SECUENCIA ID Nº 23 y SECUENCIA ID Nº 24 son específicas del VIH-2. Una secuencia diana representativa del VIH-2 (subtipo A, cepa NIH-Z) se designa en el presente documento como SEC ID Nº 15. Todos los cebadores y sondas son secuencias consenso derivadas de 31 aislados del grupo M (subtipos A, B y D) del VIH-1 y del grupo O y 14 aislados del VIH-2 de los subtipos A y B de las secuencias del VIH-2.  
60

65 En los ejemplos siguientes, las SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 6, SEC ID Nº 8, SEC ID Nº 9,

SEC ID Nº 12 y SEC ID Nº 13 se usan como cebadores de amplificación consenso específicos de la secuencia diana del VIH-1. Las SEC ID Nº 4, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº 10, SEC ID Nº 11 y SEC ID Nº 14 se usan como sondas de hibridación internas de consenso para el producto de amplificación del VIH-1. Las SEC ID Nº 16, SEC ID Nº 17, SEC ID Nº 19, SEC ID Nº 20, SEC ID Nº 23 y SEC ID Nº 24 se usan como cebadores de amplificación consenso específicos de la secuencia diana del VIH-2 y las SEC ID Nº 18, SEC ID Nº 21 y SEC ID Nº 22 se usan como sondas de hibridación interna de consenso para el producto de amplificación del VIH-2.

### Ejemplo 1

#### Preparación de los cebadores y sondas del VIH

A. Cebadores consenso de VIH-1 y VIH-2. Se diseñaron cebadores consenso para detectar todos los subtipos conocidos del VIH-1 y el VIH-2 mediante PCR de hibridación oligonucleotídica. Estos cebadores fueron las SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 3, SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 6, SEC ID Nº 8, SEC ID Nº 9, SEC ID Nº 12 y SEC ID Nº 13 para el VIH-1, y las SEC ID Nº 16, SEC ID Nº 17, SEC ID Nº 19, SEC ID Nº 20, SEC ID Nº 23 and SEC ID Nº 24 para el VIH-2. Las secuencias de los cebadores se sintetizaron usando metodología estándar para síntesis de oligonucleótidos y se haptenaron con adamantano en sus extremos 5' usando química de acoplamiento con cianoetil fosforoamidita estándar como se describe en la patente de EE.UU. Nº 5,424,414 incorporada en el presente documento por referencia.

B. Sondas consenso de VIH-1 y VIH-2. Se diseñaron sondas consenso para hibridar con la secuencia diana amplificada del VIH mediante hibridación oligonucleotídica. Estas sondas fueron las SEC ID Nº 4, SEC ID Nº 7, SEC ID Nº 10, SEC ID Nº 11 y SEC ID Nº 14 para el VIH-1, y las SEC ID Nº 18, SEC ID Nº 21 y SEC ID Nº 22 para el VIH-2. Las secuencias de las sondas se sintetizaron usando metodología estándar para síntesis de oligonucleótidos y se haptenaron con 2 carbazoles en el extremo 5' usando química de acoplamiento con cianoetil fosforoamidita estándar como se describe en la patente de EE.UU. Nº 5.464.746 (incorporada en el presente documento por referencia) y se bloquearon con fosfato en el extremo 3'-

### Ejemplo 2

#### Sensibilidad de la detección del VIH-1

Se ha notificado que el subtipo B del VIH-1 es la cepa más frecuente de VIH-1 que se encuentra en Europa y Estados Unidos, de modo que se usó para evaluar la sensibilidad de los diferentes conjuntos de cebador/sonda consenso del VIH-1. El ARN se aisló de viriones del subtipo B del VIH-1 purificados por gradiente (HIV-1<sub>MN</sub>. Advanced Biotechnologies Inc., Columbia, MD) usando el procedimiento de extracción de ARN de Qiagen y la metodología en columna como ha descrito el fabricante (Qiagen, Frankfurt, Alemania). El ARN se cuantificó en copias de ARN viral por mililitro y se diluyó en 1 ng/µl de ARN ribosómico hasta niveles adecuados para la detección.

Se evaluaron cuatro conjuntos de cebador/sonda consenso del VIH-1 diferentes: el conjunto 1 usó las SEC ID Nº 2 y 3 como cebadores y la SEC ID Nº 4 como sonda, el conjunto 2 usó las SEC ID Nº 5 y 6 como cebadores y la SEC ID Nº 7 como sonda, el conjunto 3 usó las SEC ID Nº 8 y 9 como cebadores y las SEC ID Nº 10 y 11 como sondas, y el conjunto 4 usó las SEC ID Nº 12 y 13 como cebadores y la SEC ID Nº 14 como sonda. Todas las secuencias se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Las diluciones del ARN del VIH-1 purificado se sometieron a transcripción inversa, se amplificaron con PCR y se detectaron usando los cuatro conjuntos cebador/sonda consenso en reacciones diferentes. Se realizó RT-PCR usando bicina 50 mM, pH 8,25, acetato potásico 115 mM, EDTA 0,5 mM, 8% de glicerol, 10 µg/ml de seroalbúmina bovina (BSA) y 0,02% de azida sódica. Se usó la polimerasa recombinante de *Thermus thermophilus* a una concentración de 5 unidades/reacción, con dNTP (dATP, dGTP, dTTP y dCTP) presentes a una concentración final de 0,15 mM cada una. Los cebadores se usaron a una concentración de 500 nM cada una y las sondas a una concentración de 10 nM cada una. Se usó una concentración final de MnCl<sub>2</sub> 2,5 mM en un volumen de reacción total de 0,2 ml, con un volumen de la muestra de 25 a 50 µl. El control negativo estaba compuesto por 100 ng de ARN ribosómico/reacción.

Las mezclas de reacción se sometieron a transcripción inversa y se amplificaron en un ciclador térmico Perkin-Elmer 480. Las mezclas de reacción se incubaron primero a 62°C durante 30 minutos para realizar la transcripción inversa del ARN, seguidos de 30 segundos a 94°C. Después se inició la amplificación por PCR mediante un protocolo táctil o escalonado para ayudar a las condiciones rigurosas de la reacción en las primeras etapas de la amplificación. Esto usó 8 ciclos del siguiente modo: 1 ciclo a 70°C durante 80 segundos, después a 94 °C durante 30 segundos seguidos de un ciclo de 69°C durante 80 segundos después a 94°C durante 30 segundos, seguidos de 1 ciclo de 68°C durante 80 segundos después a 94°C durante 30 segundos, seguidos de 1 ciclo de 67°C durante 80 segundos después 94°C durante 30 segundos, seguidos de 1 ciclo de 66°C durante 80 segundos después a 94°C durante 30 segundos, seguidos de 1 ciclo de 65°C durante 80 segundos, después a 94°C durante 30 segundos, seguidos de 1 ciclo de 64°C durante 80 segundos después a 94°C durante 30 segundos, seguidos de 1 ciclo de 63°C durante 80 segundos, después a 94°C durante 30 segundos. Después se realizó amplificación adicional con 35 ciclos, siendo



5 cada ciclo de 62°C durante 80 segundos y, después, 94°C durante 30 segundos. Después del ciclado térmico de las mezclas de reacción, las mezclas se mantuvieron a 97°C durante 15 minutos y se realizó oligohibridación de la sonda disminuyendo la temperatura a 4°C en 2 minutos. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta la detección de los productos de reacción.

10 Los productos de reacción se detectaron en el sistema Abbott LCx® (disponible en Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Se usó una suspensión de partículas recubiertas con anticuerpos anti-carbazol y un conjugado de anticuerpo anti-adamantano/fosfatasa alcalina (todos ellos disponibles comercialmente en Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) junto con LCx® para capturar y detectar los productos de reacción. El sustrato enzimático usado fue metil-umbeliferilfosfato (MUP), con el índice de conversión de MUP en MU (metil-umbeliferona) medido y notificado como recuentos/segundo/segundo (c/s/s),

15 Los datos de este experimento se presentan en la TABLA 3 y muestran detección del subtipo N del VIH-1 a concentraciones tan bajas como de 10 moléculas/ensayo (mol/ensayo usando los conjuntos 1, 2 y 3 de cebador/sonda para el VIH-1, y detección de 100 moléculas/ensayo usando el conjunto 4 de cebador/sonda para el VIH-1.

TABLA 3

[VIH-1] mol/ensayo	Índice del conjunto 1 LCx®	Índice del conjunto 2 LCx®	Índice del conjunto 3 LCx®	Índice de I conjunto 4 LCx®
10.000	2485,4	1389,6	1179,6	1459,3
1.000	2323,8	1370,4	1061,1	892,6
100	1452,7	1358,2	605,2	211,9
10	490,0	835,3	440,6	73,8
0	33,0	18,7	48,1	59,7

20 **Ejemplo 3**

**Sensibilidad de la detección del VIH-2**

25 Se usó el subtipo A del VIH-2 para evaluar la sensibilidad de los diferentes conjuntos cebador/sonda consenso del VIH-2. El ARN se aisló de viriones del subtipo A del VIH-2 purificados por gradiente (HIV-2<sub>NIH2</sub>, Advanced Biotechnologies Inc., Columbia, MD) usando el procedimiento de extracción de ARN de Qiagen y la metodología en columna como ha descrito el fabricante (Qiagen, Frankfurt, Alemania). El ARN se purificó de los viriones inicialmente cuantificados mediante microscopía electrónica. El ARN purificado resultante se diluyó en 1 ng/μl de ARN ribosómico hasta niveles adecuados para la detección.

30 Se evaluaron tres conjuntos de cebador/sonda consenso del VIH-2 diferentes: el conjunto 5 usó las SEC ID N° 16 y 17 como cebadores y la SEC ID N° 18 como sonda, el conjunto 6 usó las SEC ID N° 19 y 20 como cebadores y la SEC ID N° 22 como sonda (aunque también se podría haber usado también la SEC ID N° 21 como sonda sola o en combinación con la SEC ID N° 22), y el conjunto 7 usó las SEC ID N° 20 y 23 como cebadores y la SEC ID N° 21 como sonda. Todas las secuencias se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 1.

35 Las mezclas de reacción se prepararon, se sometieron a transcripción inversa, se amplificaron y se detectaron usando los tres conjuntos de cebador/sonda consenso del VIH-2 en reacciones distintas, como se describe en el ejemplo 2.

40 Los resultados presentados en la TABLA 4 muestran detección del VIH-2 a concentraciones tan bajas como de 1 molécula/ensayo usando los conjuntos 5 y 6 de cebador/sonda consenso para el VIH-2, y detección de 100 moléculas/ensayo usando el conjunto 7 de cebador/sonda para el VIH-2.

TABLA 4

[VIH-2] mol/ensayo	Índice del conjunto 5 LCx®	Índice del conjunto 6 LCx®	Índice del conjunto 7 LCx®
10.000	2254,3	1427,3	501,1
1.000	2310,5	1309,6	541,2
100	2290,6	1084,9	343,6

[VIH-2] mol/ensayo	Índice del conjunto 5 LCx®	Índice del conjunto 6 LCx®	Índice del conjunto 7 LCx®
10	1967,5	750,3	75,1
1	1116,9	371,4	49,0
0	28,4	78,6	48,1

**Ejemplo 4**

**Detección de subtipo del VIH-1**

5

La divergencia genética del VIH es el aspecto más exigente de la detección. Existe la necesidad de ensayos que detecten de forma precisa todos los subtipos, incluido el subtipo "O" más ampliamente divergente. Las muestras de suero se obtuvieron en Digene (Silver Spring, MD) de los subtipos A a F del VIH-1 y dos aislados del subtipo O del VIH-1. Se extrajo el ARN viral y se purificó de cada aislado usando columnas Qiagen y metodología como ha descrito el fabricante (Qiagen, Frankfurt, Alemania). El ARN se cuantificó en copias de ARN viral por mililitro y realizaron diluciones por diez en serie en 1 ng/µl de ARN ribosómico para la detección. La Tabla 5 muestra la cantidad de ARN (moléculas/ensayo) usada por reacción en cada dilución de la muestra para cada subtipo.

10

TABLA 5

Subtipo de VIH-1	Moléculas de ARN/ensayo				
	Dilución de la muestra				
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
A	1737	173	17,3	1,73	0,17
B	890	89	8,9	0,89	0,09
C	247	24,7	2,47	0,25	0,03
D	20,700	2070	207	20,7	2,07
E	7170	717	71,7	7,17	0,72
F	24,000	2400	240	24	2,4
HAM O	66,460	6646	664,6	66,46	6,65
LA O	149,000	14,900	1490	149	14,9

15

Los cuatro conjuntos de cebador/sonda consenso del VIH-1 diferentes se usaron en reacciones distintas para someter a transcripción inversa, amplificar y detectar el ARN de la muestra de varios subtipos del VIH-1 como se describe en el Ejemplo 2. El subtipo O solo se analizó con el conjunto 1 de cebador/sonda del VIH-1. Las tablas 6 a 9 muestran los resultados de este análisis.

20

TABLA 6

Subtipo de VIH-1	Índice del conjunto 1 LCx® (c/s/s)				
	Dilución de la muestra				
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
A	1995	1530	559	45	37
B	2103	1979	750	31	27
C	740	135	133	26	24
D	1988	2042	1907	1226	528
E	2040	1954	1584	661	71
F	2027	1967	1871	1116	461
HAM O	1315	1389	1507	1224	168
LA O	1206	1413	1509	1403	650

El conjunto 1 de cebador/sonda del VIH-1 detectó todos los subtipos del VIH-1 analizados en la Tabla 6 anterior, incluyendo los subtipos O ampliamente divergentes, en un intervalo de sensibilidad entre 100 y 1 moléculas/ensayo.

TABLA 7

Subtipo de VIH-1	Índice del conjunto 2 LCx® (c/s/s)				
	Dilución de la muestra				
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
A	1218	1207	791	165	34
B	1597	1873	1544	380	20
C	569	300	*	*	*
D	1864	1866	1796	1246	636
E	931	949	856	406	61
F	1872	1838	1882	1807	1063

5

El conjunto 2 de cebador/sonda del VIH-1 detectó todos los subtipos del VIH-1 analizados en la Tabla 7 anterior, con una sensibilidad similar a la del conjunto 1 de cebador/sonda del VIH-1.

10

TABLA 8

Subtipo de VIH-1	Conjunto 3 para el VIH-1				
	Dilución de la muestra				
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
A	+	+	-	-	-
B	+	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-
D	ND	+	+/-	-	-
E	+	+	-	-	-
F	ND	+	+	+	-

(ND= no determinado)

El conjunto 3 de cebador/sonda del VIH-1 detectó 5 de los 6 subtipos del VIH-1 analizados en la Tabla 8 anterior, con una sensibilidad de aproximadamente 200 mol/ensayo.

15

TABLA 9

Subtipo de VIH-1	Conjunto 4 para el VIH-1				
	Dilución de la muestra				
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
A	-	-	-	-	-
B	+	-	-	-	-
C	-	-	-	-	ND
D	+	+	+	-	-
E	+	+	+/-	-	-
F	+	-	-	-	-

(ND= no determinado)

El conjunto 4 de cebador/sonda del VIH-1 detectó 4 de los 6 subtipos del VIH-1 analizados en la Tabla 9 anterior, con una sensibilidad de entre 2.000 a 200 mol/ensayo.

20 **Ejemplo 5**

**Especificidad de los conjuntos de cebador/sonda VIH-1 y VIH-2**

La especificidad de los conjuntos 1 y 2 de cebador/sonda para VIH-1 se evaluó frente a ARN, que se extrajo y se purificó de muestras de suero del subtipo B del VIH-1 (cepas MN y 3B) y del VIH-2 como en el Ejemplo 4. Los dos conjuntos de cebador/sonda consenso para el VIH-1 se usaron en reacciones diferentes para someter a transcripción inversa, amplificar y detectar las diluciones 1:10 del ARN de la muestra como se describe en el Ejemplo 2. Como se muestra en la Tabla 10, ambos conjuntos de cebador/sonda del VIH-1 detectan ambos ARN del VIH-1 pero no detectan el AT del suero con VIH-2, lo que indica que los conjuntos de cebador/sonda del VIH-1 son específicos para la detección del VIH-1 y no sufren reacciones cruzadas y detectan VIH-2.

TABLA 10

ARN de la muestra	Índice del conjunto 1 LCx® del VIH-1	Índice del conjunto 2 LCx® del VIH-1
HIV-1 <sub>MN</sub>	2317	1321
HIV-1 <sub>3B</sub>	2366	1395
HIV-2	109	19

Después se evaluó la especificidad del conjunto 5 de cebador/sonda del VIH-1 frente al ARN aislado del VIH-1 purificado por gradiente como en el Ejemplo 2. Las diluciones del ARN del VIH-1 purificado se sometieron a transcripción inversa, se amplificaron mediante PCR y se detectaron como en el Ejemplo 2 usando el conjunto 5 de cebador/sonda consenso del VIH-1, usándose el conjunto 1 de cebador/sonda consenso del VIH-1 en reacciones distintas como control. Los resultados, mostrados en la Tabla 11, indican que el conjunto 5 de cebador/sonda del VIH-1 no sufre reacción cruzada y detectan el ARN del VIH-1.

TABLA 11

[VIH-1] mol/ensayo	Índice del conjunto 1 LCx® del VIH-1	Índice del conjunto 5 LCx® del VIH-2
1.000.000	1792	16
100.000	1819	15
10.000	1812	16
1.000	1823	15
100	1714	15
10	517	15
0	27	16

**Ejemplo 6****Detección de VIH-1 o VIH-2 con cebador/sondas de VIH-1 y VIH-2**

Con el fin de poder analizar el VIH-1 y el VIH-2 en una reacción en lugar de en dos reacciones distintas, los conjuntos de cebador/sonda para VIH-1 y VIH-2 tendrían que usarse en la misma reacción. La viabilidad de esto se analizó mezclando conjuntos de cebador/sonda para VIH-1 y VIH-2 usándolos para detectar ARN purificado de VIH-1 o de VIH-2.

El ARN de VIH-1 y VIH-2 se purificó y cuantificó como en los Ejemplos 2 y 3, respectivamente. El conjunto 1 de cebador/sonda para VIH-1 y el conjunto 8 de cebador/sonda para VIH-2, que consistía en las SEC ID N° 16 y 24 como cebadores y la SEC ID N° 18 como sonda, preparados como se describe en el Ejemplo 1, se usaron juntos o por separado para realizar transcripción inversa, amplificar y detectar las diluciones de ARN de VIH-1 y VIH-2 como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

TABLA 12

[VIH-1] mol/ensayo	Índice LCx® del VIH-1	Índice LCx® del VIH-1/2	[VIH-2] mol/ensayo	Índice LCx® del VIH-2	Índice LCx® del VIH-1/2
10.000	2114,5	1858,3	10.000	2094,1	2261,6
1.000	1708,0	1550,2	1.000	2209,2	1966,8

## ES 2 445 495 T3

<b>[VIH-1] mol/ensayo</b>	<b>Índice LCx® del VIH-1</b>	<b>Índice LCx® del VIH-1/2</b>	<b>[VIH-2] mol/ensayo</b>	<b>Índice LCx® del VIH-2</b>	<b>Índice LCx® del VIH-1/2</b>
<b>100</b>	680,8	539,6	<b>100</b>	2216,2	1066,6
<b>10</b>	112,6	151,0	<b>10</b>	1879,8	254,9
<b>1</b>	ND	ND	<b>1</b>	805	66,8
<b>0</b>	50,4	74,5	<b>0</b>	31	90,4

(ND= no determinado)

5 Aunque se produjo una disminución de 1,0 a 1,5 log en la detección del VIH-2 cuando se usaron los conjuntos de cebador/sonda del VIH-1 y VIH-2 en la misma mezcla de reacción, la sensibilidad siguió siendo aceptable a aproximadamente 10 moléculas por reacción. Es importante el hecho de que la detección del VIH-1 no se alteraba por la inclusión del conjunto de cebador/sonda del VIH-2 con el conjunto de cebador/sonda del VIH-1 en las mezclas de reacción del VIH-1, permaneciendo la sensibilidad a aproximadamente 10 moléculas por reacción.

### LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Abbott Laboratories
- <120> Cebadores de ácido nucleico y sondas para detectar VIH-1 y VIH-2
- 15 <130> 5191/MNM/ms
- <150> US 08/876.546
- <151> 16-06-1997
- 20 <160> 24
- <210> 1
- <211> 2348
- <212> ARN
- <213> Virus de la inmunodeficiencia humana 1
- 25 <220>
- <223> ARN genómico para el virus de la inmunodeficiencia humana 1
- 30 <400> 1

ES 2 445 495 T3

acagtattag taggacctac acctgtcaac ataattggaa gaaatctggt gactcagctt 60  
 ggggtgcactt taaattttcc cattagtctt attgaaactg taccagtaaa attaaagcca 120  
 ggaatggatg gcccaaaagt taaacaatgg ccattgacag aagaaaaaat aaaagcatta 180  
 atagaaatth gtacagaaat ggaaaaggaa gggaaaatth caaaaattgg gcctgaaaat 240  
 ccatacaata ctccagtatt tgccataaag aaaaaagaca gtactaaatg gagaaaatta 300  
 gtagatttca gagaacttaa taagaaaact caagacttct gggagttca attaggaata 360  
 ccacatcctg cagggttaaa aaagaaaaaa tcagtaacag tactggatgt ggggtgatgca 420  
 tatttttcag ttcccttaga taaagacttc aggaagtata ctgcatttac catacctagt 480  
 ataaacaatg aaacaccagg gattagatat cagtacaatg tgcttcaca gggatggaaa 540  
 ggatcaccag caatattcca aagtagcatg acaaaaatct tagagccttt tagaaaacaa 600  
 aatccagaca tagttatcta tcaatacatg gatgatttgt atgtaggac tgacttagaa 660  
 atagggcagc atagagcaaa aatagaggaa ctgagacgac atctgttgag gtggggattt 720  
 accacaccag acaaaaaaca tcagaaagaa cctccattcc tttggatggg ttatgaactc 780  
 catcctgata aatggacagt acagcctata gtgctaccag aaaaagacag ctggactgtc 840  
 aatgacatac agaagttagt gggaaaattg aattgggcaa gtcagattta cgcagggatt 900  
 aaagtaaagc aattatgtaa actccttaga ggaaccaaaag cactaacaga agtaatacca 960  
 ctaacagaag aagcagagct agaactggca gaaaacaggg aaattctaaa agaaccagta 1020  
 catggagtgt attatgacct atcaaaagac ttaatagcag aagtacagaa gcaggggcaa 1080  
 ggccaatgga catatcaaat ttatcaagag ccatttaaaa atctgaaaac aggcaaatat 1140  
 gcaagaatga ggggtgccc cactaatgat gtaaaacaat taacagaggc agtgcaaaaa 1200  
 atagccacag aaagcatagt aatatgggga aagactccta aatttagact acccatacaa 1260

ES 2 445 495 T3

aaagaaacat gggaaacatg gtggacagag tatacgtaag ccacctggat tcctgagtgg 1320  
 gaggttgtca ataccctcc cttagtgaaa ttatggtacc agttagagaa agaaccata 1380  
 gtaggtgcag aaactttcta tgtagatggg gcagctaaca gggagactaa aaaaggaaaa 1440  
 gcaggatatg ttactaacag aggaagacaa aaggttgtct ccctaactga cacaacaaat 1500  
 cagaagactg agttacaagc aattcatcta gctttgcaag attcaggggtt agaagtaaac 1560  
 atagtaacag actcacaata tgcattagga atcattcaag cacaaccaga taaaagtga 1620  
 tcagagttag tcagtcaaat aatagagcag ttaataaaaa aggaaaagggt ctatctggca 1680  
 tgggtaccag cacacaaagg aattggagga aatgaacaag tagataaatt agtcagtgtc 1740  
 ggaatcagga aagtactatt tttagatgga atagataagg cccaagaaga ccatgagaaa 1800  
 tatcacagta attggagagc aatggctagt gactttaacc taccacctat agtagcaaaa 1860  
 gaaatagtag ccagctgtga taaatgtcag ctaaaaggag aagccatgca tggacaagta 1920  
 gactgtagtc caggaatatg gcaactagat tgtacacatt tagaaggaaa agttatcctg 1980  
 gtagcagttc atgtagccag tggatacata gaagcagaag ttattccagc agagacaggg 2040  
 caggagacag catactttct cttaaaatta gcaggaagat ggccagtaaa aacaatacat 2100  
 acagacaatg gcccgaattt caccagtact acggttaagg ccgcctgttg gtggacggga 2160  
 atcaagcagg aatttggcat tcctacaat ccccaaagtc aaggagtaat agaatctatg 2220  
 aataaagaat taaagaaaat tataggacag gtaagagatc aggctgaaca tcttaagaga 2280  
 gcagtacaaa tggcagtatt catccacaat tttaaaagaa aaggggggat tgggggggtac 2340  
 agtgcagg 2348

5 <210> 2  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220> Lineal  
 <223> ADN sintético  
  
 10 <400> 2  
 attccctaca atccccaag tcaaggagt 29  
  
 15 <210> 3  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220> Lineal  
 <223> ADN sintético  
  
 <400> 3  
 cctgcactgt acccccaat cc 22  
  
 25 <210> 4  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220> Lineal  
 <223> ADN sintético

	<400> 4 acagcagtac aaatggca	18	
5	<210> 5 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> Lineal <223> ADN sintético		
15	<400> 5 ggagcagaaa cttctatgt agatgg	26	
20	<210> 6 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
25	<220> Lineal <223> ADN sintético		
25	<400> 6 catattgtga gtctgttact atgtttact	29	
30	<210> 7 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> Lineal <223> ADN sintético		
35	<400> 7 taggaaaagc aggatatg	18	
40	<210> 8 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> Lineal <223> ADN sintético		
45	<400> 8 ggtacagtat tagtaggacc tacacctgt	29	
50	<210> 9 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
55	<220> Lineal <223> ADN sintético		
55	<400> 9 ggccattgtt taacttttgg gccatcca	28	
60	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
65	<220> Lineal <223> ADN sintético		



<400> 10  
 attagtccta ttgaaactgt 20

5

<210> 11  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10

<220> Lineal  
 <223> ADN sintético

<400> 11  
 ataagcccca tagcc 15

15

<210> 12  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20

<220> Lineal  
 <223> ADN sintético

<400> 12  
 cctagtataa acaatgagac accagg 26

25

<210> 13  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30

<220> Lineal  
 <223> ADN sintético

<400> 13  
 gatcctacat acaagtcac catgta 26

35

<210> 14  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40

<220> Lineal  
 <223> ADN sintético

45

<400> 14  
 ggatggaaag gacacca 18

50

<210> 15  
 <211> 2689  
 <212> ARN  
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana 1

55

<220>  
 <223> ARN genómico para el virus de la inmunodeficiencia humana 1

<400> 15

ES 2 445 495 T3

ttgctgcacc	icaattctct	ctttggaaaa	gaccagtagt	cacagcacac	attgagggtc	60
agccagtaga	agttttgtta	gacacaaggg	ctaacgactc	aatagtagca	ggaatagagt	120
tagggagcaa	ttatagtcca	aaaatagtag	gaggaatagg	gggattcata	aataccaagg	180
aatataaaaa	tgtagaata	gaagtcctag	gtaaaaggg	aaaagccacc	ataatgacag	240
gtgatacccc	gatcaacatt	tttggcagaa	atgttctgac	agcttttaggc	atgtcattaa	300
acctgccagt	tgccaagata	gaaccaataa	aaataatgct	aaagccaggg	aaagatggac	360
caagactaaa	acaatggcct	ttaacaaaag	aaaaaataga	agcactaaaa	gaaatctgtg	420
aaaaaatgga	aaaagaaggc	cagctagaag	aagcacctcc	aactaatcct	tataatacco	480
ccacatttgc	aatcaagaaa	aaggacaaaa	acaaatggag	aatgctaata	gactttaggg	540
agctaaacia	ggtaactcag	gatttcacag	aaattcagtt	aggaattcca	cacccagcag	600
gattggccaa	aaagaggaga	attactgtac	tagatgtagg	ggatgcttac	ttttccatac	660
cactacatga	ggactttaga	cagtatactg	cattcactct	accatcagta	aacaatgcag	720
aaccaggaaa	aagatatata	tacaaagtcc	taccacaggg	gtggaagggg	tcaccagcaa	780
tttttcaata	cacaatgagg	cagatcttag	aaccattcag	aaaagcaaac	gaggatgtca	840
ttatcattca	gtacatggat	gatatcttaa	tagccagcga	caggacagac	ttagaacatg	900

ES 2 445 495 T3

acaaagtggc cctgcagcta aaagaacttc taaatggact aggattttcc accccagatg 960  
 agaaattcca gaaagaccct ccatatcgct ggatgggcta tgaattatgg ccaactaaat 1020  
 ggaagttgca aaaaatacag ctgccccaaa aagaagtatg gacagtcaat gacatccaaa 1080  
 agctagtggg tgtcctaaat tgggcagcac aaatctacc aggataaaag accaaacacc 1140  
 tatgtaggct aattagagga aaaatgacac tcacagaaga ggtacagtgg acagaattag 1200  
 cagaagcaga gctagaggaa aacagaatta tcttaagcca gaaacaagaa ggacactatt 1260  
 accaggaaga aaaaaagtta gaagcaacag tccagaaaga tcaagacaat cagtggacat 1320  
 ataaggtaca ccagggggag aaaattctca aagggtgggaa aatatgcaa gataaaaaat 1380  
 acccatacca acgggtcaga ttgttagcac aggtagttca aaaaatagga aaagaagcac 1440  
 tagtcatttg gggacggata ccaaaatttc acctaccagt agagagagat acctgggagc 1500  
 agtgggtggg taactactgg caagtaacat ggatcccaga ctgggacttt gtatctacc 1560  
 caccactggc caggctagca tttaacctgg taggagagcc tgtaccaggc gcagaaactt 1620  
 tctacacaga tggatcctgc aataggcagt caaaagaagg gaaagcagga tatataacag 1680  
 atagagggag agacagggtg aaagtattag agcaaaactac caatcagcaa gcagaattag 1740  
 aagcctttgc aatggcacta acagactcag gtccaaaagc taatattata gtagactcac 1800  
 aatatgtaat ggggatagta gcaggccaac caacagagtc agagaataga atagtaaate 1860  
 agatcataga agaaatgata aagaaagaag caatctatgt tgcgtgggtc ccagcccaca 1920  
 aaggcatagg aggaaaccag gaagtagatc atttagtaag tcagggcatt agacaagtat 1980  
 tattcctaga gaaaatagaa cccgcgcagg aagaacatga aaaatatcat agcaatataa 2040  
 aagaactgtc ccataaattt ggaataccca agctagtggc aagacaaata gtaaaccacat 2100  
 gtgcccatgt gcaacagaaa ggggaggcta tacatgggca agtaaagca gaactaggca 2160  
 cttggcaaat ggactgcaca catttagaag gaaaagtcac tatagtagca gtacatgttg 2220  
 caagtggatt tatagaggca gaagttatcc cacaggaate aggaaggcaa acagcactgt 2280  
 tcttactgaa actggccagt aggtggccaa taacacacct gcacacagat aatgggtgca 2340  
 acttcacttc acaggaagtg aaaatggtag catgggtgggt aggtatagaa caaacctttg 2400  
 gagtgcctta caatccaca agccaaggag tagtagaagc aatgaatcat catctaaaaa 2460  
 atcagataga cagaattaga gagcaggcaa atacagtaga aacaatagta ttaatggcag 2520  
 ttcattgcat gaattttaaa agaaggggag gaatagggga tatgacccca gcagaaagaa 2580  
 taatcaatat gatcaccaca gaacaagaaa tacaattcct ccaagcaaaa aattcaaaat 2640  
 taaaaaattt tgggtctat ttcagagaag gcagagatca gctgtggaa 2689

<210> 16  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220> Lineal  
 <223> ADN sintético

5

10

<400> 16  
 actgatggca gttcattgca tgaatttaa aag 33

5  
 <210> 17  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10  
 <220> Lineal  
 <223> ADN sintético

<400> 17  
 ttccacagct gatctctgcc ttctctg 27

15  
 <210> 18  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20  
 <220> Lineal  
 <223> ADN sintético

<400> 18  
 cagaacaaga aatacaattc 20

25  
 <210> 19  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30  
 <220> Lineal  
 <223> ADN sintético

<400> 19  
 cctcaattct ctcttggaa aagacc 26

35  
 <210> 20  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40  
 <220> Lineal  
 <223> ADN sintético

45  
 <400> 20  
 aaatgttgat tgggtatct cctgtc 26

50  
 <210> 21  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55  
 <220> Lineal  
 <223> ADN sintético

<400> 21  
 ccaaaaatag taggggg 17

60  
 <210> 22  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65  
 <220> Lineal  
 <223> ADN sintético

# ES 2 445 495 T3

	<400> 22 atagtagcag gaataga	17
5	<210> 23 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> Lineal <223> ADN sintético	
	<400> 23 caatagtagc aggaatagag ttagg	25
15	<210> 24 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> Lineal <223> ADN sintético	
25	<400> 24 cacagctgat cctgccttc tctgtaatag ac	32

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un conjunto de cebador/sonda para detectar los subtipos A-F del VIH-1 que consisten en el conjunto 2 de cebador/sonda (SEC ID N° 5, 6 y 7).
- 10 2. Un método para detectar los subtipos A-F del VIH-1 en una muestra de ensayo, comprendiendo las etapas de:
- (a) formar una mezcla de reacción que comprende reactivos de amplificación de ácido nucleico, el conjunto de cebador/sonda de la reivindicación 1 y una muestra de ensayo que contiene una secuencia diana del VIH;
  - (b) someter la mezcla a las condiciones de amplificación para generar al menos una copia de una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana;
  - (c) hibridar la sonda con la secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana, para formar un híbrido que comprende la sonda y la secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana; y
  - (d) detectar el híbrido como indicación de la presencia del VIH en la muestra de ensayo.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, donde dichos reactivos de amplificación incluyen una enzima que tiene actividad de transcriptasa inversa y dicho procedimiento comprende además la etapa, después de la etapa (a) y antes de la etapa (b), de formar un ADNc a partir de un genoma del VIH.
- 20 4. El método de la reivindicación 2, donde la etapa (b) se repite entre 10 y 100 veces.
5. Un kit para detectar los subtipos A-F del VIH-1, que comprende:
- a) el conjunto 2 de cebador/sonda (SEC ID N° 5, 6 y 7), y
  - b) reactivos de amplificación.
- 25 6. El kit de la reivindicación 5, donde dichos reactivos de amplificación comprenden una enzima que tiene actividad de transcriptasa inversa.