

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 471 092**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2007 E 07867584 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2121980**

54 Título: **Sondas de ácido nucleico y métodos para detectar parásitos de Plasmodium**

30 Prioridad:

30.11.2006 US 861812 P

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

25.06.2014

73 Titular/es:

**ID-FISH TECHNOLOGY, INC. (100.0%)
926 EAST RIVER PARKWAY
SANTA CLARA, CA 95054, US**

72 Inventor/es:

**SHAH, JYOTSNA S.;
WRONSKA, DANUTA;
WELTMAN, HELENA;
HARRIS, NICK;
MARK, OLIVA y
SHERINI-WARD, SUZANNE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 471 092 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

Sondas de ácido nucleico y métodos para detectar parásitos de *Plasmodium*

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 *Plasmodium* es un género de protozoos parasitarios. La infección con este género se conoce como malaria. El parásito siempre tiene dos hospedantes en su ciclo vital: un vector mosquito y un hospedante vertebrado. Al menos diez especies infectan humanos, incluyendo *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*. La malaria es una enfermedad infecciosa que está extendida en las regiones tropicales y subtropicales. La malaria representa una amenaza a la supervivencia de hombres, mujeres y niños. Infecta a entre 300 y 500 millones de personas cada año y provoca entre uno y tres millones de muertes al año, la mayoría niños pequeños en el África Sub-Sahariana.

10 La malaria es una de las enfermedades infecciosas más comunes y supone un enorme problema de salud pública. La enfermedad está causada por parásitos protozoos del género *Plasmodium*. Las formas más graves de la enfermedad están causadas por *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, pero otras especies relacionadas (*Plasmodium ovale* y *Plasmodium malariae*) también pueden infectar a humanos. La determinación de la especie infecciosa ayuda a determinar el curso de tratamiento para el paciente.

15 El diagnóstico preferido y más fiable de la malaria es el examen microscópico de láminas sanguíneas, ya que las cuatro especies parasitarias presentan características distintivas. Tradicionalmente se usan dos tipos de láminas sanguíneas. Las láminas finas son similares a las láminas sanguíneas habituales y permiten la identificación de especies debido a que la apariencia de los parásitos se conserva mejor en esta preparación. Las láminas gruesas permiten al microscopista realizar un escrutinio de un volumen mayor de sangre y son aproximadamente once veces
20 más sensibles que la lámina fina, por lo que detectar niveles bajos de infección es más sencillo con láminas gruesas, pero la apariencia del parásito se ve mucho más distorsionada y por tanto la distinción entre diferentes especies puede ser mucho más difícil.

25 Con láminas gruesas, un microscopista con experiencia puede detectar niveles de parásito (o parasitemia) de hasta un 0,0000001 % de células sanguíneas rojas. Sin embargo, el diagnóstico microscópico puede ser difícil debido a que los trofozoítos precoces ("anillados") de las cuatro especies parecen idénticos y nunca es posible diagnosticar especies en base a una única forma anillada; la identificación de especie se basa siempre en varios trofozoítos.

30 En áreas donde no se disponga de microscopio, existen tests de detección de antígenos que sólo requieren una gota de sangre. OptiMAL-IT® (TCS Bio Sciences, Buckingham, Inglaterra) detectará con fiabilidad *falciparum* hasta en un 0,01 % de parasitemia y no *falciparum* hasta en un 0,1 %. Paracheck-Pf® (Orchard Biomedical Systems, India) detectará parasitemias de hasta un 0,002 % pero no distinguirá entre malaria de *falciparum* y no *falciparum*. También se pueden detectar ácidos nucleicos usando reacción en cadena de polimerasa. Esta técnica es más precisa que la microscopía. Sin embargo, es costosa y requiere un laboratorio especializado. Además, los niveles de parasitemia no se correlacionan necesariamente con la progresión de la enfermedad, particularmente cuando el parásito es capaz de adherirse a las paredes de los vasos sanguíneos. En algunos laboratorios clínicos se dispone
35 de métodos moleculares limitados y de ensayos rápidos en tiempo real, por ejemplo, QT-NASBA (amplificación basada en secuencias de ácido nucleico cuantitativa en tiempo real, basada en reacción en cadena de polimerasa) pero todavía se están desarrollando. Por tanto, es necesario desarrollar herramientas de diagnóstico de tecnología sencilla para detectar niveles bajos de parasitemia en campo.

40 Lo que se necesita son reactivos y métodos para la detección y discriminación rápida y precisa de diversas especies de *Plasmodium* causantes de malaria.

Se considera que la solicitud de patente de EE.UU. nº 5.792.609 representa la técnica anterior más próxima.

SUMARIO DE LA INVENCION

45 Esta invención se refiere a sondas de ácido nucleico que detectan y discriminan entre diferentes especies de parásitos de *Plasmodium*, por ejemplo, en ensayos de hibridación. Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención se caracteriza por fragmentos de ácido nucleico como los reivindicados en la Reivindicación 2. Los fragmentos pueden usarse como sondas para detectar *Plasmodium* en un ensayo de hibridación. La invención también incluye sondas (ADN, ARN y PNA) que pueden discriminar entre *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*. En el contexto de la presente invención, el término "discriminar entre" (o términos similares) significa que la sonda se une a ácido nucleico (p.ej., ARN, ADN, ARNr [ARN ribosomal] o ADNr [ADN ribosomal]) de una especie de
50 forma más favorable que de las otras 3 especies.

55 En un segundo aspecto, la invención se caracteriza por un método como el reivindicado en la reivindicación 1 para detectar la presencia de *Plasmodium* en una muestra. En este método, se pone en contacto una muestra con un fragmento de ácido nucleico en condiciones que permitan que el ácido nucleico se hibride con un ácido nucleico de *Plasmodium*. La detección del fragmento de ácido nucleico ligado al ácido nucleico de *Plasmodium* de la muestra se usa como indicio de la presencia de *Plasmodium* en la muestra. La detección con sondas de la presente invención

que discrimina entre las cuatro especies de *Plasmodium* enumeradas antes indica la presencia de dicha especie de *Plasmodium*.

5 En una realización de este aspecto de la invención, el fragmento de ácido nucleico contiene una secuencia seleccionada, preferiblemente, de entre al menos cinco, más preferiblemente al menos diez y lo más preferiblemente al menos quince nucleótidos consecutivos, o la secuencia entera de la sonda PGenus 1 o su secuencia complementaria de longitud completa.

10 En una segunda realización de este aspecto de la invención, el fragmento de ácido nucleico contiene una secuencia seleccionada, preferiblemente, de entre al menos cinco, más preferiblemente al menos diez o lo más preferiblemente al menos quince nucleótidos consecutivos, o la secuencia entera de la sonda MalF1 o su secuencia complementaria de longitud completa.

En otra realización adicional de este aspecto de la invención, el fragmento de ácido nucleico contiene una secuencia seleccionada, preferiblemente, de entre al menos cinco, más preferiblemente al menos diez y lo más preferiblemente al menos quince nucleótidos, o la secuencia entera de la sonda MalF2 o su secuencia complementaria de longitud completa.

15 En otra realización adicional de este aspecto de la invención, el fragmento de ácido nucleico contiene una secuencia seleccionada, preferiblemente, de entre al menos cinco, más preferiblemente al menos diez y lo más preferiblemente al menos quince nucleótidos, o la secuencia entera de la sonda Mal1.8F o su secuencia complementaria de longitud completa.

20 En otra realización adicional de este aspecto de la invención, el fragmento de ácido nucleico contiene una secuencia seleccionada, preferiblemente, de entre al menos cinco, más preferiblemente al menos diez y lo más preferiblemente al menos quince nucleótidos, o la secuencia entera de la sonda Mal1.8R, o su secuencia complementaria de longitud completa.

25 Una ventaja de las sondas PGenus 1, MalF1, MAIF2, Mal1.8F y Mal1.8R es que detectan las tres especies de *Plasmodium* evaluadas, y por tanto no se limitan a detectar una única especie de *Plasmodium*. Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la misma y también a partir de las reivindicaciones.

30 En aspectos específicos, la presente invención contempla un método para detectar la presencia de *Plasmodium* en una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de: poner en contacto dicha muestra con una sonda para detectar *Plasmodium* en un ensayo de hibridación, donde dicha sonda discrimina entre especies de *Plasmodium*, en condiciones que permitan a dicha sonda hibridarse con ácido nucleico de *Plasmodium*; y detectar dicha sonda unida a dicho ácido nucleico de *Plasmodium* en dicha muestra como una indicación de la presencia de *Plasmodium* en dicha muestra.

35 En la realización precedente, el fragmento de ácido nucleico comprende una secuencia que se selecciona de entre al menos cinco nucleótidos consecutivos de sonda PV1, PV2, PF3, PF4, PF5, PM1 o PO1 o de su secuencia complementaria de longitud completa.

40 En otros aspectos, la presente invención contempla un método para detectar la presencia de *Plasmodium* en una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de: poner en contacto dicha muestra con un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia seleccionada de entre al menos cinco nucleótidos consecutivos de una sonda seleccionada de un grupo que consiste en PGenus1, MalF1, MalF2, Mal1.8F, Mal1.8R, PV1, PV2, PF2, PF3, PF4, PF5, PM1 y PO1 o su secuencia complementaria de longitud completa, en las condiciones que permitan que dicho ácido nucleico se hibride a ácido nucleico de *Plasmodium*; y detectar dicho fragmento de ácido nucleico unido a dicho ácido nucleico de *Plasmodium* en dicha muestra como una indicación de la presencia de *Plasmodium* en dicha muestra.

45 En la realización precedente, el fragmento de ácido nucleico consta de una secuencia seleccionada de entre la secuencia de longitud completa, al menos quince nucleótidos consecutivos, al menos diez nucleótidos consecutivos, al menos cinco nucleótidos consecutivos de una sonda procedente de un grupo que consiste en PGenus1, MalF1, MalF2, Mal1.8F, Mal1.8R, PV1, PV2, PF2, PF3, PF4, PF5, PM1 y PO1 o su secuencia complementaria de longitud completa.

50 La presente invención también contempla un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia seleccionada de entre al menos cinco nucleótidos consecutivos de una sonda seleccionada de un grupo que consiste en PGenus1, MalF1 y MalF2, Mal1.8F, Mal1.8R, PV1, PV2, PF2, PF3, PF4, PF5, PM1, PO1 o su secuencia complementaria de longitud completa.

55 La presente invención también contempla un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia seleccionada de entre al menos diez nucleótidos consecutivos de una sonda seleccionada de un grupo que consiste en PGenus1, MalF1 y MalF2, Mal1.8F, Mal1.8R, PV1, PV2, PF2, PF3, PF4, PF5, PM1, PO1 o su secuencia complementaria de longitud completa.

La presente invención también contempla un fragmento de ácido nucleico que comprende la secuencia completa seleccionada de una sonda seleccionada de un grupo que consiste en PGenus1, MalF1 y MalF2, Mal1.8F, Mal1.8R, PV1, PV2, PF2, PF3, PF4, PF5, PM1, PO1 o su secuencia complementaria de longitud completa.

5 En aspectos específicos, la presente invención contempla un método para seleccionar sondas de ácido nucleico que discriminan entre las especies *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, método que comprende: preparar un fragmento de ácido nucleico o polipéptido de ácido nucleico, PNA correspondiente, o complementario, a una secuencia de al menos cinco nucleótidos de ácido nucleico procedente de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*; comparar la capacidad de la sonda para detectar una o más de las especies de *Plasmodium* en un ensayo de hibridación; y seleccionar la sonda o sondas que detecten una, dos o tres especies de *Plasmodium* pero no las
10 cuatro especies de *Plasmodium*.

La presente invención también contempla un método para detectar y diferencia entre *P. falciparum*, *P. Vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* en una muestra, comprendiendo dicho método: proporcionar: i) una muestra de un sujeto que se sospecha que padece malaria y ii) sondas que comprenden un ácido nucleico adecuado para detectar y diferenciar entre *P. falciparum*, *P. Vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*; poner en contacto dicha muestra con dichas sondas en las
15 condiciones adecuadas para la hibridación de dichas sondas a las dianas; y determinar la presencia de *P. falciparum*, *P. Vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, si la hay, en la muestra.

En una realización, el método contempla que la sonda para la detección de *P. falciparum* se seleccione a partir de una secuencia de ácido nucleico de al menos cinco nucleótidos consecutivos de uno o más de PF1, PF2, PF3, PF4 o PF5. En otra realización, el método contempla que la sonda se seleccione a partir de una secuencia de ácido
20 nucleico de al menos diez nucleótidos contiguos de uno o más de PF1, PF2, PF3, PF4 o PF5. En otra realización adicional, el método contempla que la sonda se seleccione a partir de una secuencia de ácido nucleico de al menos quince nucleótidos contiguos de uno o más de PF1, PF2, PF3, PF4 o PF5.

En una realización, el método contempla que la sonda para detectar *P. Vivax* se seleccione de una secuencia de ácido nucleico de al menos cinco nucleótidos contiguos de uno o más de PV1 o PV2. En otra realización, el método contempla que la sonda se seleccione a partir de una secuencia de ácido nucleico de al menos diez nucleótidos
25 contiguos de uno o más de PV1 o PV2. En otra realización adicional, el método contempla que la sonda se seleccione de una secuencia de ácido nucleico de al menos quince nucleótidos contiguos de uno o más de PV1 o PV2.

En una realización, el método contempla que las sondas para detectar *P. malariae* se seleccionen a partir de una secuencia de ácido nucleico de al menos cinco nucleótidos contiguos de PM1 y uno o más de PF1, PF2, PF3, PF4 o PF5, y donde una muestra es positiva para *P. malariae* si la sonda de al menos cinco nucleótidos contiguos de PM1 da positivo y la sonda de al menos cinco nucleótidos contiguos de PF1, PF2, PF3, PF4 o PF5 da negativo. En otra
30 realización, el método contempla que las sondas se seleccionen a partir de la secuencia de ácido nucleico de al menos diez nucleótidos contiguos de uno o más de PF1, PF2, PF3, PF4 o PF5 y al menos diez nucleótidos contiguos de PM1. En otra realización adicional, el método contempla que las sondas se seleccionen a partir de la secuencia de ácido nucleico de al menos quince nucleótidos contiguos de uno o más de PF1, PF2, PF3, PF4 o PF5 y al menos quince nucleótidos contiguos de PM1.

En una realización, el método contempla que las sondas para detectar *P. ovale* se seleccionen a partir de una secuencia de ácido nucleico de al menos cinco nucleótidos contiguos de PO1 y uno o más de PF1, PF2, PF3, PF4 o PF5, y donde una muestra es positiva para *P. ovale* si la sonda de al menos cinco nucleótidos contiguos de PO1 da positivo y la sonda de al menos cinco nucleótidos contiguos de PF1, PF2, PF3, PF4 o PF5 da negativo. En otra
40 realización, el método contempla que las sondas se seleccionen a partir de la secuencia de ácido nucleico de al menos diez nucleótidos contiguos de uno o más de PF1, PF2, PF3, PF4 o PF5 y al menos diez nucleótidos contiguos de PO1. En otra realización adicional, el método contempla que las sondas se seleccionen a partir de la secuencia de ácido nucleico de al menos quince nucleótidos contiguos de uno o más de PF1, PF2, PF3, PF4 o PF5 y al menos quince nucleótidos contiguos de PO1.

En cualquiera de las realizaciones precedentes, la sonda o sondas usadas pueden ser la secuencia de nucleótidos entera tal como se describe en la presente memoria o su cadena complementaria, así como la secuencia complementaria de los cinco, diez o quince nucleótidos contiguos de las sondas.

50 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención presenta sondas de ácido nucleico para detectar parásitos de *Plasmodium* (p.ej., *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*) en, por ejemplo, ensayos de hibridación. Las sondas de la invención pueden usarse en métodos para detectar la presencia de *Plasmodium* en una muestra biológica. En estos métodos, se pone en contacto una sonda de la invención con una muestra biológica (p.ej., sangre entera, CSF o una muestra de tejido) en
55 un ensayo de hibridación y la detección de la sonda ligada al ácido nucleico de la muestra se usa como indicio de la presencia de *Plasmodium* en la muestra. Las sondas incluidas en la invención pueden identificarse por:

A (1) preparar un fragmento de ácido nucleico o un polipéptido de ácido nucleico, ADN (es decir, una sonda) correspondiente, o complementaria a una secuencia de al menos diez nucleótidos de ácido nucleico de *P.*

falciparum y (2) comparar la capacidad de la sonda para detectar todas las especies de *Plasmodium* en un ensayo de hibridación. Las sondas que se hibridan a *P. falciparum* de forma más favorable que a las otras tres especies se incluyen en la invención.

5 B (1) preparar un fragmento de ácido nucleico o PNA (es decir, una sonda) correspondiente, o complementaria a una secuencia de al menos diez nucleótidos de ácido nucleico de *P. vivax* y (2) comparar la capacidad de la sonda para detectar todas las especies de *Plasmodium* en un ensayo de hibridación. Las sondas que se hibridan a *P. vivax* de forma más favorable que a las otras tres especies se incluyen en la invención.

10 C (1) preparar un fragmento de ácido nucleico o PNA (es decir, una sonda) correspondiente, o complementaria a una secuencia de al menos diez nucleótidos de ácido nucleico de *P. malariae* y (2) comparar la capacidad de la sonda para detectar todas las especies de *Plasmodium* en un ensayo de hibridación. Las sondas que se hibridan a *P. malariae* de forma más favorable que a las otras tres especies se incluyen en la invención.

15 D (1) preparar un fragmento de ácido nucleico o PNA (es decir, una sonda) correspondiente, o complementaria a una secuencia de al menos diez nucleótidos de ácido nucleico de *P. ovale* y (2) comparar la capacidad de la sonda para detectar todas las especies de *Plasmodium* en un ensayo de hibridación. Las sondas que se hibridan a *P. ovale* de forma más favorable que a las otras tres especies se incluyen en la invención.

20 Los ácidos nucleicos de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* pueden obtenerse a partir de muestras biológicas (tal como sangre entera, médula ósea, CSF) procedentes de individuos infectados, usando métodos estándares de aislamiento de ácido nucleico en la técnica. A partir del cultivo también se puede obtener *P. falciparum* (así como *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*). Por ejemplo, se puede obtener ADN que codifica ARN ribosomal de *Plasmodium* mediante amplificación PCR de ADN preparado a partir de una muestra de sangre entera de un paciente infectado usando los métodos y los cebadores descritos en la presente memoria y conocidos en la técnica.

25 Se puede seleccionar cualquier secuencia de *Plasmodium* (p.ej., una secuencia que codifica ARN ribosomal 58, 5.8S, 18S o 28S) como secuencia candidata para la identificación de sondas. Las secuencias preferidas son aquellas que divergen de secuencias análogas en parásitos no humanos de *Plasmodium* u otros parásitos de protozoos como, por ejemplo, *Babesia* o *Thileria*, determinado por comparación filogénica. Las sondas de ácido nucleico de la invención tienen una longitud de al menos 10 nucleótidos y pueden contener desoxirribonucleótidos (sondas de ADN), ribonucleótidos (sondas de ARN), ácido nucleico de péptido (sondas PNA) o combinaciones o modificaciones de los mismos. Las sondas pueden ser de cadena sencilla o de cadena doble y pueden prepararse mediante cualquiera de una serie de métodos estandarizados de la técnica. Por ejemplo, las sondas pueden prepararse mediante síntesis química, digestión de restricción de endonucleasa de un vector (p.ej., un plásmido que contiene una secuencia correspondiente a la sonda), amplificación de cadena de reacción de polimerasa (PCR), o transcripción *in vitro* de un vector que contenga una secuencia correspondiente a la sonda (véase, p.ej., Ausubel, et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing, Nueva York, N.Y., 1994, incorporada a la presente memoria a modo de referencia). Las sondas pueden ser marcadas durante o tras la síntesis. Por ejemplo, los nucleótidos marcados que contengan, p.ej., radioisótopos (p.ej., ³²P, ³⁵S o ³H), biotina o digoxigenina, se pueden incorporar a la sonda durante la síntesis. Las sondas que contengan biotina se detectan mediante el uso de un reactivo secundario tal como avidina o estreptavidina, que contiene un marcador detectable tal como un fluorocromo (p.ej., fluoresceína o rodamina) o una enzima (p.ej., fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano). De forma similar, las sondas que contengan digoxigenina pueden detectarse usando un anticuerpo antidigoxigenina marcado. Las sondas también pueden ser marcadas después de la síntesis, p.ej., mediante traducción de apodo o uso de T4 ARN ligasa, poli(A) polimerasa, en métodos estandarizados (véase, p.ej., Ausubel et al., ver anterior). Las sondas también pueden contener nucleótidos modificados con el objetivo de aumentar la estabilidad de la sonda. Por ejemplo, se pueden usar ribonucleótidos que contengan grupos 2'-O-alquilo en el grupo ribosa. Las sondas también pueden contener modificaciones que faciliten la captura de la sonda sobre un soporte sólido. Por ejemplo, se pueden añadir colas de poli-dA o poli-deaza-guanosina a los extremos 3' de las sondas, usando transferasa terminal, con el fin de facilitar la unión de la sonda a un soporte sólido, p.ej., partículas magnéticas marcadas con poli-dT o poli-dC. Las sondas se pueden purificar antes de usarse, mediante métodos estandarizados tales como electroforesis de gel de poli(acrilamida) desnaturizante, cromatografía de líquidos de alta resolución o cromatografía de filtración de gel (véase, p.ej., Ausubel, et al., ver anterior). Las sondas de la invención se pueden usar en cualquier ensayo de hibridación estándar para detectar la presencia de *Plasmodium* en una muestra. Por ejemplo, se pueden usar ensayos Southern blot, dot blot, de hibridación *in situ*, detección de hibridación en tiempo real mediante biosensores o sonda dual, de hibridación tipo sándwich (véase, p.ej., la Solicitud de Patente de EE.UU. n° 07/826.657 [ahora Patente de EE.UU. n° 5.519.127] y la Patente de EE.UU. n° 5.629.156 [Número de Publicación Internacional WO 94/10335], todas las cuales se incorporan a la presente memoria a modo de referencia). Alternativamente, las sondas pueden usarse como cebadores en un ensayo de reacción en cadena de polimerasa (véase, p.ej., Ausubel, et al., ver anterior). Las muestras biológicas que pueden analizarse usando las sondas y métodos de la invención incluyen sangre entera, CSF, médula ósea y muestras de tejido procedentes, p.ej., de bazo. El ácido nucleico se extrae de la muestra mediante métodos estandarizados (excepto en el caso de la hibridación *in situ*, en la que las células se mantienen intactas) y se analiza usando las sondas de los ensayos enumerados anteriormente. En el ensayo se puede usar una única sonda o combinaciones de sondas. Las condiciones de hibridación usadas con las sondas (p.ej., en los métodos de la invención) entran dentro del rango de, por ejemplo, 30-50 % de formamida a 25

°C - 42 °C o mezclas de GuSCN y formamida entre 25 - 37 °C. Como es "sabido por el especialista en la técnica", la selección de las condiciones de hibridación depende de la longitud y el contenido de nucleótidos (es decir, de la comparación de GC y AT) de la sonda. Por consiguiente, las condiciones de hibridación pueden ajustarse para acomodar dichos factores. Adicionalmente, el uso de diferentes sales (p.ej., tiocianato de guanidina o hidrocloreuro de guanidina en comparación con NaCl) y de agentes desnaturizantes (p.ej., NP-40, dodecilsulfato sódico) puede requerir un ajuste de la concentración salina y de la temperatura, como puede determinar fácilmente el especialista en la técnica.

A continuación se muestran ejemplos no limitantes de las condiciones de hibridación que pueden usarse en la presente invención. En los análisis Southern blot, se pueden usar las siguientes condiciones de hibridación: de 30 % a 50 % de formamida en 2xSSC a 42°C. Tras la hibridación, los filtros se lavan usando métodos estándares. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo tres lavados de 15 minutos post-hibridación a 25 °C en 2 x SSC a 0,1 x SSC y 0,1 % de SDS con el objetivo de eliminar las sondas no ligadas. Para los blots de ARN, se llevaron a cabo hibridaciones en formamida al 30 % a temperatura ambiente durante una noche. El exceso de sondas fue eliminado lavando tres veces 15 minutos en 2 x SSC con un 0,1 % de SDS.

El término "hibridación" se refiere al emparejamiento de ácidos nucleicos complementarios. La hibridación y la fuerza de hibridación (es decir, la fuerza de la asociación entre los ácidos nucleicos) se ve afectada por factores tales como el grado de complementariedad entre los ácidos nucleicos, la severidad de las condiciones aplicadas, la T_m del híbrido formado, y la relación G - C en los ácidos nucleicos. Se dice que una única molécula que contenga emparejamiento de ácidos nucleicos complementarios en su estructura está "auto-hibridada".

Es bien sabido que se pueden emplear numerosas condiciones equivalentes para alcanzar condiciones de hibridación adecuadas; se consideran factores tales como la longitud y la naturaleza (ADN, ARN, composición de bases) de la sonda y la naturaleza de la diana (ADN, ARN, composición de bases, presente en disolución o inmovilizada, etc.) y la concentración de las sales y otros componentes (p.ej., la presencia o la ausencia de formamida, sulfato de dextrano, polietilenglicol) y la disolución de hibridación puede variar para generar condiciones de baja severidad de hibridación diferentes de las condiciones enumeradas antes, pero equivalentes. Adicionalmente, en la técnica se conocen condiciones de alta severidad (p.ej., aumento de la temperatura de la hibridación y/o etapas de lavado, el uso de formamida en la disolución de hibridación, etc.).

Para la hibridación *in situ*, se pueden usar las siguientes condiciones, tal como se describen en la Patente de EE.UU. nº 6.165.723 y en la Solicitud de Patente de EE.UU. nº 11/494.430 (que se incorporan a la presente memoria a modo de referencia): GuSCN (de 1,5 a 3,5 M dependiendo de la secuencia de la sonda) entre temperatura ambiente y 37 °C o mezclas de GuSCN y formamida entre temperatura ambiente y 37 °C durante entre 30 minutos y una hora, seguido de lavados en SSC (de 2 X a 0,1 X) y 0,1 % de SDS.

EJEMPLOS

Sin una elaboración adicional, se cree que el especialista en la técnica, en base a la presente descripción, puede utilizar la presente invención en su máxima extensión. Por tanto, las siguientes realizaciones específicas deben considerarse meramente ilustrativas, y en ningún caso limitativas del resto de la descripción.

Hibridación de las sondas PGenus1, PGenus2, MalF1, MalF2, Mal1.8F, Mal1.8R con muestras de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*.

Los datos del análisis dot-blot se muestran en la Tabla 1. En estos experimentos, se usó por punto aproximadamente 0,1 ug de un plásmido que contenía secuencias de nucleótidos que codifican las respectivas subunidades de ARNr 18S. Los blots fueron hibridados con sondas marcadas con dig usando las condiciones de hibridación descritas antes.

Para el caso del ARN, se sintetizó ARN y se generaron manchas de 0,1 ug en 6 x SSC sobre membrana de nitrocelulosa. La hibridación con sondas marcadas con dig (sondas marcadas con digoxigenina) se llevó a cabo durante una noche a temperatura ambiente en formamida. Se usó este método para comparar las señales de hibridación entre los diferentes organismos y sondas.

Las sondas que se hibridan con todas las especies de ARNr 18 de todas las especies de *Plasmodium* son PGenus1, PGenus2, MalF1, MalF2, Mal1.8F y Mal1.8R. Las sondas PGenus1, PGenus2 y Mal1.8R se hibridaron con ARNr 18S de las tres especies de *Plasmodium*.

Sondas específicas de ARNr 18S del Género *Plasmodium*

Las sondas específicas del género *Plasmodium* de la invención incluyen las sondas PGenus1, PGenus2, MalF1, MalF2, Mal1.8F y Mal1.8R, que presentan las secuencias:

PGenus1	5'-TCTCGCTTGCGCGAATACTCG-3' (SEQ ID NO: 1)
PGenus2	5'-CCAAAGACTTTGATTCTCAT-3' (SEQ ID NO: 2)
Malf1	5' -CAGATACCGTCGTAATCTTA -3' (SEQ ID NO: 3)
Malf2	5'-CGAAAGTTAAGGGAGTGAAGAC-3' (SEQ ID NO: 4)
Mal1.8F	5'-atgtagaaactgcaacggc -3' (SEQ ID NO: 5)
Mal1.8R	5'-cagcacaatctgatgaatcatgc-3' (SEQ ID NO: 6)

Sondas específicas de ARNr 18S de la Especie *Plasmodium*

Las sondas específicas de la especie *Plasmodium* de la invención incluyen sondas PV1 que tienen las secuencias de una sonda seleccionada entre PV1, PV2, PV3, PF1, PF2, PF3, PF4, PF5, PF6, PF7, PF8, PM1, PO1 o su secuencia complementaria de longitud completa.

5

Sondas específicas de *P. vivax*

PV1	5'-TCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAAATTCTTATTTT- 3' (SEQ ID No: 7)
PV2	5'-TACACACTCAAGAAATGAATCAAGAGTGC-3' (SEQ ID No: 8)

Sondas específicas de *P. falciparum*

PF1	5'-GCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATGACTT-3' (SEQ ID NO: 9)
PF2	5'-CCTAACAAATACTTATCCAAAGATAAAAATCAAGGA-3' (SEQ ID No: 10)
PF3	5'-ATTTTAAACACTTTTCATCCAACACCTAGTCG-3' (SEQ ID No: 11)
PF4	5'-TTACAAAACCAAAAAT3'GGCCTTGCATTGTTATTT-3' (SEQ ID No: 12)
PF5	5'-TCCAATTGTTACTCTGGGAAGG-3' (SEQ ID No: 13)

10 **Sonda específica de *P. malariae***

PM1	5'-GAAACACTCATATATAAGAATGTCTC-3' (SEQ ID No: 14)
-----	--

Sonda específica de *P. ovale*

PO1	5' - AATTTCCCCGAAAGGAATTTTC-3' (SEQ ID No: 15)
-----	--

Tabla 1

Sondas	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>
PGenus1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
PGenus2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Malf1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Malf2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Mal1.8F	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Mal1.8R	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Sondas	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>
PV1	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
PV2	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
PF1	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
PF2	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
PF3	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
PF4	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
PF5	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
PM1	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
PO1	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo

Nota: Todas las sondas excepto MalF1, MalF2 y Mal1.8F se hibridan también a ARNr.

5 En un ejemplo de la presente invención, las muestras son evaluadas para determinar la presencia de *Plasmodium*
sp. y las especies de *Plasmodium* detectadas son diferenciadas mediante el uso de las sondas de la presente
 invención. Se evalúa una muestra con sondas de al menos cinco, diez o quince nucleótidos contiguos de las sondas
 10 PV1 y/o PV2, las sondas PF1, PF2, PF3, PF4 y/o PF5, la sonda PM1 y la sonda PO1, o la sonda entera o sus
 secuencias complementarias. Se determina que las muestras que dan positivo para las sondas PV1 y/o PV2 están
 infectadas con *P. vivax*. Se determina que las muestras que dan positivo para las sondas PF1, PF2, PF3, PF4 y/o
 PF5 están infectadas con *P. falciparum*. Se determina que las muestras que dan positivo para la sonda PM1 pero no
 para PF1, PF2, PF3, PF4 y/o PF5 están infectadas con *P. malariae*. Se determina que las muestras que dan positivo
 para la sonda PO1 pero no para PF1, PF2, PF3, PF4 y/o PF5 están infectadas con *P. ovale*.

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

5 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (j i) MOLÉCULA TIPO: ADN

(x i) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

20 **TCTCGCTTGC GCGAATACTC G**

(3) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (j i) MOLÉCULA TIPO: ADN

(x i) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

35 **CCAAAGACTT TGATTTCTCA T**

(4) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

45 (j i) MOLÉCULA TIPO: ADN

(x i) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

50 **CAGATACCGT CGTAATCTTA**

(5) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 22 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (j i) MOLÉCULA TIPO: ADN

(x i) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

cgaaagttaa gggagtgaag ac

(6) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:5

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(j i) MOLÉCULA TIPO: ADN

(x i) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:5

15

atgtagaaac tgccaacggc

(7) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:6

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(j i) MOLÉCULA TIPO: ADN

(x i) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:6

30

cagcacaatc tgatgaatca tgc

(8) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:7

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 36 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

40

(j i) MOLÉCULA TIPO: ADN

(x i) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:7

45

TCTAAGAATA AACTCCGAAG AGAAAATTCT TATTTT

(9) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:8

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 29 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

55

(j i) MOLÉCULA TIPO: ADN

(x i) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:8

60

TACACACTCA AGAAATGAAT CAAGAGTGCC

(10) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:9

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 31 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(j i) MOLÉCULA TIPO: ADN

10 (x i) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:9

GCAATCTAAA AGTCACCTCG AAAGATGACT T

15 (11) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 1 0

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 36 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(j i) MOLÉCULA TIPO: ADN

25 (x i) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:10

CCTAACAAAT ACTTATCCAA AGATAAAAAT CAAGGA

30 (12) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:11

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 31 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(j i) MOLÉCULA TIPO: ADN

40 (x i) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:11

ATTTTAAACA CTTTCATCCA ACACCTAGTC G

45 (13) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:12

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 35 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(j i) MOLÉCULA TIPO: ADN

55 (x i) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:12

TTACAAAACC AAAAATTGGC CTTGCATTGT TATTT

60 (14) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:13

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 22 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(j i) MOLÉCULA TIPO: ADN

(x i) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:13

10

TCCAATTGTT ACTCTGGGAA GG

(15) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 14

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15

- (A) LONGITUD: 26 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

20

(j i) MOLÉCULA TIPO: ADN

(x i) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:14

25

GAAACACTCA TATATAAGAA TGTCTC

(16) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30

- (A) LONGITUD: 22 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35

(j i) MOLÉCULA TIPO: ADN

(x i) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:15

40

AATTTCCCCG AAAGGAATTT TC

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia de *Plasmodium* en una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de:

5 a) poner en contacto dicha muestra con una sonda de ácido nucleico para detectar *Plasmodium* en un ensayo de hibridación, donde dicha sonda discrimina entre especies de *Plasmodium*, en las condiciones que permitan que dicha sonda se hibride con ácido nucleico de *Plasmodium*, donde dicha sonda se selecciona de un grupo que consiste en las sondas de SEQ ID NO.: 1 para detectar PGenus1, SEQ ID NO.: 3 para detectar MalF1, SEQ ID NO.: 4 para detectar MalF2, SEQ ID NO.: 5 para detectar Mal1.8F, SEQ ID NO.: 6 para detectar Mal1.8R, SEQ ID NO.: 7 para detectar PV1, SEQ ID NO.: 8 para detectar PV2, SEQ ID NO.: 10 para detectar PF2, SEQ ID NO.: 11 para detectar PF3, SEQ ID NO.: 12 para detectar PF4, SEQ ID NO.: 13 para detectar PF5, y SEQ ID NO.: 14 para detectar PM1 o sus secuencias complementarias; y

b) detectar dicha sonda unida a dicho ácido nucleico de *Plasmodium* en dicha muestra como una indicación de la presencia de *Plasmodium* en dicha muestra.

15 2. Un fragmento de ácido nucleico que consiste en la secuencia completa seleccionada de una sonda seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO.: 1, SEQ ID NO.: 3, SEQ ID NO.: 4, SEQ ID NO.: 5, SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 7, SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12, SEQ ID NO.: 13 y SEQ ID NO.: 14 o sus secuencias complementarias.

3. Un método para detectar y diferenciar entre *P. falciparum*, *P. Vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* en una muestra, comprendiendo dicho método:

20 a) proporcionar: i) una muestra procedente de un sujeto que se sospecha que padece malaria y ii) sondas que comprenden ácido nucleico adecuado para detectar y diferenciar entre *P. falciparum*, donde dicha sonda para detectar *P. falciparum* se selecciona entre: a) una secuencia de ácido nucleico que consiste en uno o más de SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12 o SEQ ID NO.: 13 sus secuencias complementarias, *P. Vivax*, donde dicha sonda para detectar *P. Vivax* se selecciona entre: a) una secuencia de ácido nucleico que consiste en uno o más de SEQ ID NO.: 7 o SEQ ID NO.: 8 o sus secuencias complementarias, *P. malariae*, donde dichas sondas para detectar *P. malariae* se seleccionan entre: a) una secuencia de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO.: 14, o sus secuencias complementarias, y una o más de SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12 o SEQ ID NO.: 13, o sus secuencias complementarias, y donde una muestra es positiva para *P. malariae* si la sonda que tiene la SEQ ID NO.: 14 da positivo y la sonda correspondiente a SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12 o SEQ ID NO.: 13 da negativo y *P. ovale*, donde dichas sondas para detectar *P. ovale* se seleccionan entre: a) una secuencia de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO.: 15, o sus secuencias complementarias, y una o más de SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12 o SEQ ID NO.: 13, o sus secuencias complementarias, y donde una muestra es positiva para *P. ovale* si la sonda con la SEQ ID NO.: 15 da positivo y la sonda con SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12 o SEQ ID NO.: 13 da negativo;

b) poner en contacto dicha muestra con dichas sondas en las condiciones adecuadas para la hibridación de dichas sondas a las dianas; y

c) determinar la presencia de *P. falciparum*, *P. Vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, si existe, en la muestra.