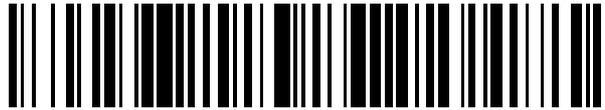


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 479 065**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.1998 E 04077617 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 1568787**

54 Título: **Métodos de uso de secuencias de ácido nucleico como cebadores y sondas en la amplificación y detección de todos los subtipos de VIH-1**

30 Prioridad:

08.08.1997 EP 97202455

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

23.07.2014

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX BV (100.0%)
BOSEIND 15
5281 RM BOXTEL, NL**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 479 065 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

Métodos de uso de secuencias de ácido nucleico como cebadores y sondas en la amplificación y detección de todos los subtipos de VIH-1

5 La presente invención se refiere a un método de detección de secuencias de ácido nucleico que se pueden utilizar en el campo del diagnóstico de virus, más específicamente en el diagnóstico de infecciones con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) que causa el SIDA.

10 Si bien el diagnóstico de virus convencional se ha basado predominantemente en la detección de antígenos víricos o anticuerpos específicos de ellos, en los últimos años la atención se ha desplazado hacia métodos para la detección directa del genoma de virus o secuencias de ácido nucleico derivadas del mismo, tanto ARN como ADN. Estos métodos se basan generalmente en la hibridación de ácido nucleico. La hibridación de ácido nucleico se basa en la capacidad de dos hebras de ácido nucleico que contienen secuencias complementarias de emparejarse entre sí en condiciones apropiadas, formando así una estructura de doble hebra. Cuando se etiqueta la hebra complementaria, se puede detectar la etiqueta y es indicativa de la presencia de la secuencia diana. Especialmente en combinación con métodos para la amplificación de secuencias de ácido nucleico, estos métodos se han convertido en una herramienta importante de diagnóstico vírico, en particular para la detección de virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

15 Las técnicas de amplificación de ácido nucleico son especialmente útiles como técnica adicional en los casos en los que los métodos serológicos ofrecen resultados dudosos o en los casos en los que puede existir un período de tiempo considerable entre la infección y el desarrollo de los anticuerpos para el virus. Con VIH, normalmente, la seroconversión se puede producir unos 3 a 6 meses después de la exposición al virus. Por tanto, aunque no se detecten anticuerpos con los inmunoensayos convencionales, pueden ser detectables ADN provírico o ARN vírico circulante. Asimismo, en terapia antivírica de seguimiento, los métodos basados en la amplificación de ácido nucleico presentan varias ventajas con respecto a los métodos serológicos. Especialmente, los métodos de amplificación cuantitativa proporcionan una poderosa herramienta para valorar los cambios en la cantidad de virus presentes antes y durante la terapia.

20 La elección de los oligonucleótidos que se han de utilizar como cebadores y sondas en la amplificación y detección de secuencias de ácido nucleico es crítica para la sensibilidad y especificidad del ensayo. Normalmente, la secuencia que se ha de amplificar está presente únicamente en una muestra (por ejemplo en una muestra de sangre obtenida de un enfermo que supuestamente padece la infección vírica) en cantidades diminutas. Los cebadores deberán ser suficientemente complementarios de la secuencia diana como para permitir una amplificación eficaz del ácido nucleico vírico presente en la muestra. Si los cebadores no se hibridan de forma apropiada (debido a un desapareamiento de las bases de los nucleótidos en ambas hebras) con la secuencia diana, la amplificación se verá seriamente dañada. Esto afectará a la sensibilidad del ensayo y puede tener como resultado unos resultados de ensayo negativos falsos. Debido a la heterogeneidad de los genomas víricos, se pueden obtener resultados de ensayo negativos falsos cuando los cebadores y las sondas son capaces de reconocer las secuencias presentes solamente en parte de las variantes del virus. El virus VIH presenta una alta heterogeneidad. Se ha demostrado la variabilidad genética entre aislados de diferentes continentes, pero también entre distintos individuos y entre diferentes estadios de la enfermedad. En función del análisis de secuencia, se han identificado dos grupos dentro de VIH-1: el grupo M (M de "major" - principal), y el grupo O (O de "outlier" anexo). Dentro del grupo M, se han asignado subtipos (A-H), que constituyen cada uno de ellos un grupo de secuencias por separado filogenético, y se están identificando otros adicionales. Esta variación de secuencia no está uniformemente distribuida en todo el genoma. El genoma VIH-1, al igual que todos los genomas retrovíricos, consiste de forma aproximada en las siguientes regiones: el gen *gag* del genoma VIH-1 es la región que codifica las proteínas de núcleo del virus (por ejemplo, p24); el gen *env* codifica una proteína de precursor grande, gp 160, que es procesada para convertirse en las proteínas de envuelta gp 120 y gp41. El gen *pol* codifica la polimerasa del virus (transcriptasa inversa). Las regiones de Repetición Terminal Larga (LTR) son las regiones en el genoma vírico que participan en la integración del virus con la célula huésped y en la regulación de la transcripción de genes víricos. Algunas regiones son más propensas a la variación de secuencia que otras. Sobre todo, en la secuencia de dominio *env*, la variación puede alcanzar hasta un 30% entre miembros de los diferentes subtipos. De forma ideal, la selección del cebador se deberá basar en la información sobre la variabilidad entre una cepa en secuencias de cebador candidato y las consecuencias de falta de emparejamiento en sitios de cebador. McCutcheon et al., J. AIDS, 4, 1241-1250, 1991, utiliza PCR para realizar una comparación genética de diferentes aislados de VIH-1. Utilizando PCR anclada (se utilizaron cebadores de varios sentidos con un cebador antisentido constante; se seleccionaron cebadores de regiones relativamente conservadas en *gag*, *env* y LTR). Se investigó el efecto del desapareamiento de cebador en la cantidad de producto de PCR obtenido. El desapareamiento en el extremo 3' del cebador disminuyó la cantidad del producto a veces en más de 100 veces.

50 La detección de todos los subtipos de VIH-1 conocidos actualmente es de una importancia extrema, sobre todo en lo que se refiere al control del paciente, la seguridad de la sangre y los productos sanguíneos y los estudios clínicos y epidemiológicos. Los ensayos actuales para la amplificación y la posterior detección de secuencias de ácido nucleico derivadas de VIH-1 se basan normalmente en la amplificación de secuencias en la región *gag* del genoma vírico. Estos ensayos han sido desarrollados para el subtipo B, que es el principal subtipo en países europeos y en los

Estados Unidos. Sin embargo, la presencia de otros subtipos, que estaban antes confinados geográficamente, está aumentando debido a los frecuentes desplazamientos entre estos países y, por ejemplo, países africanos. Por lo tanto, se necesitan ensayos sensibles con los que se puedan detectar tantas variantes de virus VIH-1 como sea posible (preferiblemente todas).

- 5 La investigación dirigida a la identificación de grupos de cebadores adecuados para una amplificación fiable de secuencias de ácido nucleico derivadas de VIH-1 ha estado en curso durante los años pasados. Engelbrecht et al., J. Virol. Meth., 55, 391-400, 1995, describen un estudio dirigido al desarrollo de un protocolo de PCR específico y sensible utilizando pares de cebadores *env*, *gag* y LTR para detectar subtipos presentes en el Cabo Oeste, Sudáfrica. Se analizaron 24 cepas que, según se sabía, pertenecían a los subtipos B, C y D. Se observó que el
- 10 comportamiento de los pares de cebador dependía en gran medida de la optimización de las condiciones de reacción para los diferentes pares de cebador. Únicamente cuando se utilizaron condiciones menos estrictas (por ejemplo, con el par de cebador LTR, se necesitaron un aumento del tiempo de ciclo y temperaturas de hibridación) se pudieron detectar estas cepas de VIH en particular con suficiente sensibilidad y reproducibilidad con todos los pares de cebador.
- 15 Zazzi et al. J. Med. Virol., 38, 172-174, 1992, desarrolló una reacción de PCR en dos etapas (utilizando cebadores anidados) para detectar ADN de VIH-1 en muestras clínicas. Los cebadores utilizados para la amplificación se derivaron del gen *gag* y de la región LTR. Los pacientes sometidos a ensayo en este estudio fueron todos ellos de zonas colindantes, lo que hace probable que representaran solamente un número limitado de diferentes cepas víricas.
- 20 Vener et al., en Bio Techniques, 21, 248-255, 1996 describen un método de PCR cuantitativo en el que se utilizan cebadores anidados derivados de LTR. Este procedimiento fue ensayado solamente en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), infectadas con VIH-1_{MN}. Por lo tanto, no se puede decir nada de la adecuación de los cebadores utilizados para la detección de diferentes subtipos de virus. La invención se refiere a un método para la detección de ácido nucleico de VIH-1 en una muestra en donde la muestra se somete a una reacción de
- 25 amplificación de ácido nucleico basada en transcripción usando un par de oligonucleótidos y reactivos de amplificación adecuados, y se detecta la presencia de cualquier ácido nucleico amplificado, en donde el par de oligonucleótido consiste en:

Un primer oligonucleótido que tiene 26-50 nucleótidos de longitud y que comprende la SEQ. ID:1:

G GGC GCC ACT GCT AGA GA

- 30 Y un Segundo oligonucleótido que tiene 15-26 nucleótidos de longitud y que comprende al menos un fragmento de 10 nucleótidos de la SEQ ID:5:

CTC AAT AAA GCT TGC CTT GA

- Las secuencias de oligonucleótido usadas en la presente invención están localizadas en la parte LTR del genoma vírico de VIH. Se ha encontrado que al utilizar las secuencias de la presente invención en métodos para la
- 35 amplificación basada en la transcripción y detección de ácidos nucleicos se puede obtener una detección sensible y específica de VIH-1. El beneficio de las secuencias usadas en la presente invención reside principalmente en el hecho de que, con la ayuda de cebadores y sondas que comprenden estas secuencias, se puede detectar el ácido nucleico de todos los subtipos de VIH-1 conocidos actualmente, con una alta precisión y sensibilidad. Hasta ahora, no se ha desarrollado ningún par de cebador o sondas de hibridación que permitiera la detección de dicha amplia
- 40 gama de variantes de VIH-1.

- Se conocen otros cebadores basados en LTR del documento EP-0887427, en donde se describe la secuencia TGTTCCGGGCGCCACTGCTAGAGA del cebador 23-mero. El documento EP-0617132 describe pares de cebador en los que uno de los cebadores solapa con el cebador de la SEQ ID 1, mientras que el segundo cebador de los pares descritos allí son diferentes de la SEQ ID5. Bell & Ratner (AIDS Res. Hum. Retrovirus 5(1), 87-95 (1989)) describe los cebadores TCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCTCAAGT y GTCCCTGTTCGGGCGCCACT y su uso en PCR.
- 45

- Se conocen varias técnicas para la amplificación de ácidos nucleicos en la técnica. Un ejemplo de una técnica para la amplificación de un segmento diana de ADN es la llamada "reacción en cadena de polimerasa" (PCR). Con la técnica de PCR, se aumenta exponencialmente el número de copias de un segmento diana en particular con una serie de ciclos. Se utiliza un par de cebadores y, en cada ciclo, se hibrida un cebador de ADN con el extremo 3' de
- 50 cada una de las dos hebras de la secuencia diana de ADN de doble hebra. Se extienden los cebadores con una ADN polimerasa en presencia de los distintos mononucleótidos para generar ADN de doble hebra de nuevo. Se separan las hebras del ADN de doble hebra entre sí por desnaturalización térmica y cada hebra sirve como plantilla para la hibridación del cebador y la posterior elongación en un ciclo posterior. El método de PCR ha sido descrito por Saiki et al., Science 230, 135, 1985, y en las patentes europeas nº EP 200362 y EP 201184.

- 55 Otra técnica para la amplificación de ácidos nucleicos es el llamado sistema de amplificación basado en transcripción (TAS). El método TAS se describe en la solicitud de patente internacional Nº WO 88/10315. Las técnicas de amplificación basadas en la transcripción incluyen normalmente el tratamiento del ácido nucleico diana con dos

oligonucleótidos, incluyendo uno de ellos una secuencia promotora, para generar una plantilla que incluye un promotor funcional. Se transcriben múltiples copias de ARN desde dicha plantilla que pueden servir como base para una posterior amplificación.

5 Un método de amplificación basado en la transcripción continua isotérmica es el llamado proceso NASBA ("NASBA"), tal como se describe en la patente europea nº EP 329822. NASBA incluye el uso de ARN polimerasa T7 para transcribir múltiples copias de ARN a partir de una plantilla que incluye un promotor T7. En el documento EP 408295 se describen otras técnicas de amplificación basadas en la transcripción. El documento EP 408295 se refiere principalmente a un método de amplificación basado en la transcripción de dos enzimas. Los métodos de amplificación basados en la transcripción, por ejemplo el método NASBA descrito en el documento EP 329822, se emplean normalmente con un grupo de oligonucleótidos, proporcionándose en uno de ellos una secuencia de promotor que es reconocida por una ARN polimerasa dependiente de ADN como, por ejemplo polimerasa T7. Dentro de la técnica se conocen varias modificaciones de las técnicas basadas en la transcripción. Estas modificaciones incluyen por ejemplo el uso de oligonucleótidos bloqueados (en los que se puede incorporar una secuencia de promotor). Estos oligonucleótidos están bloqueados para inhibir una reacción de extensión a partir de ellos (documento US5554516). Se pueden utilizar uno o más "cebadores promotor" (oligonucleótidos provistos con una secuencia de promotor) en técnicas de amplificación basadas en la transcripción, combinadas opcionalmente con el uso de uno o más oligonucleótidos que no están provistos con una secuencia de promotor. Para la amplificación de ARN, la tecnología preferible es una técnica de amplificación basada en la transcripción. La amplificación mediante el uso de PCR, se puede basar también en una plantilla de ARN. La PCR real requiere ser precedida de una etapa de transcripción inversa para copiar el ARN en ADN (RT-PCR). Sin embargo, si se utiliza RT-PCR para la detección de transcriptos víricos, es necesaria la diferenciación de productos de PCR derivados de mARN y ADN. Se puede aplicar el tratamiento de ADNsa antes de RT-PCR (Bitsch, A. et al., J. Infect. Dis 167, 740-743., 1993; Meyer, T. et al., Mol. Cell Probes. 8, 261-271, 1994), pero a veces no es eficaz en la eliminación del ADN contaminante de forma suficiente (Bitsch, A. et al., 1993).

25 En contraposición a RT-PCR, NASBA, que se basa en la transcripción de ARN mediante ARN polimerasa T7 (Kievits et al., 1991; Compton, 1991) no requiere diferenciación entre productos de amplificación derivados de ARN y ADN ya que utiliza ARN como su principal diana. NASBA permite una amplificación específica de dianas de ARN incluso en un entorno de ADN.

30 El uso de los oligonucleótidos según la invención no está limitado a ninguna técnica de amplificación en particular ni modificación concreta de la misma. Es evidente que los oligonucleótidos según la invención encuentran aplicación en muchas técnicas de amplificación de ácido nucleico diferentes, y diversos métodos para detectar la presencia de ácido nucleico (amplificado) de VIH. Los oligonucleótidos de la presente invención se pueden utilizar igualmente en métodos de amplificación cuantitativa. En el documento EP 525882 se describe un ejemplo de dicho métodos cuantitativo.

35 De acuerdo con la invención, se usa la amplificación basada en la transcripción.

El término "oligonucleótido" tal como se utiliza aquí se refiere a una molécula que consiste en dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos. Dichos oligonucleótidos se pueden utilizar como cebadores y sondas.

40 Naturalmente, basándose en las secuencias de los oligonucleótidos de la presente invención, se pueden preparar también análogos de oligonucleótidos. Dichos análogos pueden constituir estructuras alternativas como "PNA" (moléculas con una estructura de tipo péptido en lugar de la estructura de azúcar de fosfato del ácido nucleico normal) o similares. Es evidente que estas estructuras alternativas, que representan las secuencias de la presente invención forman parte de la presente invención igualmente.

45 El término "cebador" tal como se utiliza aquí se refiere a un oligonucleótido que se da tanto de forma natural (p. ej. como un fragmento de restricción) o es producido sintéticamente, que es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario de la hebra de ácido nucleico (plantilla o secuencia diana) cuando se coloca en las condiciones adecuadas (por ej., tampón, sal, temperatura y pH) en presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización de ácido nucleico, como por ejemplo polimerasa dependiente de ARN o dependiente de ADN. Un cebador debe ser suficientemente largo como para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia de un agente para la polimerización. Un cebador típico contiene al menos aproximadamente 10 nucleótidos de longitud de una secuencia sustancialmente complementaria u homóloga de la secuencia diana, aunque se prefieren cebadores algo más largos. Normalmente, los cebadores contienen aproximadamente 15-26 nucleótidos, si bien se pueden emplear cebadores más largos, sobre todo cuando los cebadores contienen secuencias adicionales como, por ejemplo, una secuencia de promotor para una polimerasa en particular.

55 Normalmente, un grupo de cebadores consistirá en al menos dos cebadores, uno "corriente arriba" y otro cebador "corriente abajo" que definen conjuntamente el amplificado (la secuencia que será amplificada mediante el uso de dichos cebadores).

Principalmente, para el uso en técnicas de amplificación basada en transcripción, los oligonucleótidos según la

invención se pueden unir también a una secuencia de promotor. El término “secuencia de promotor” define una región de una secuencia de ácido nucleico que es reconocida específicamente por una ARN polimerasa que se une a una secuencia reconocida e inicia el proceso de transcripción a través del cual se produce el transcrito de ARN. En principio, se puede emplear cualquier secuencia de promotor para la que se conoce y está disponible una polimerasa que es capaz de reconocer la secuencia de iniciación. Los promotores conocidos y útiles son aquellos que son reconocidos por determinadas ARN polimerasas bacteriofagas como, por ejemplo, bacteriofagos T3, T7 o SP6. Los oligonucleótidos unidos a una secuencia de promotor se denominan comúnmente “cebadores de promotor”. No obstante, su función como cebador, por ej., el punto de partida para una reacción de elongación, se puede bloquear, tal como se ha mencionado antes, o estar ausente en algunos modos de realización de las reacciones de amplificación basadas en la transcripción.

Debe entenderse que los oligonucleótidos que consisten en las secuencias de la presente invención pueden contener supresiones, adiciones y/o sustituciones menores de bases de ácido nucleico, en un grado en el que dichas alteraciones no afecten negativamente al rendimiento del producto obtenido en ningún grado significativo. Cuando se utilizan los oligonucleótidos según la presente invención como sondas, las alteraciones no deberían tener como resultado la reducción de la eficacia de hibridación de la sonda. Por ejemplo, en el caso de técnicas de amplificación basadas en la transcripción, en las que se puede incorporar en uno o más de los cebadores una secuencia de promotor, la introducción de una secuencia de hibridación rica en purina (=G ó A), inmediatamente después de la secuencia de promotor, puede proporcionar un efecto positivo en la transcripción (cuando hay C y T se puede producir una transcripción abortiva). Si no está disponible dicha secuencia en el ácido nucleico diana, se puede insertar una secuencia rica en purina en el oligonucleótido inmediatamente después de los últimos tres restos G de la secuencia promotor. Las secuencias de la presente invención se reflejan como secuencias de ADN. Los equivalentes de ARN de estas secuencias forman igualmente parte de la presente invención.

Los oligonucleótidos preferidos según la presente invención son oligonucleótidos que consisten esencialmente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

SEQ ID 1: G GGC GCC ACT GCT AGA GA

SEQ ID 5: CTC AAT AAA GCT TGC CTT GA

SEQ ID 6: TCT GGT AAC TAG AGA TCC CTC

SEQ ID 7: TAG TGT GTG CCC GTC TGT

SEQ ID 8: AGT GTG TGC CCG TCT GTT

SEQ ID 9: aat tct aat acg act cac tat agg gAG AGG GGC GCC ACT GCT AGA GA

SEQ ID 9: incluye en realidad la secuencia tal como reflejan SEQ ID 1. En la SEQ ID 9, la secuencia de la SEQ ID 1 está operativamente unida a una secuencia de promotor (la secuencia de promotor T7). Esto hace que las secuencias sean especialmente adecuadas para su uso como cebador corriente arriba en una técnica de amplificación basada en transcripción como, por ejemplo, NASBA.

Un modo de realización preferido de la presente invención es el que consiste en un combinación de dos oligonucleótidos según la invención, para su uso como grupo en la amplificación de ácido nucleótido.

Dicho par de oligonucleótidos, para su uso como grupo en la amplificación de una secuencia diana localizada dentro de la región LTR del genoma de VIH-1, consiste en un primer oligonucleótido de 26-50 nucleótidos de longitud y que comprende la secuencia de:

SEQ ID 1: G GGC GCC ACT GCT AGA GA

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

SEQ ID 5: CTC AAT AAA GCT TGC CTT GA

Uno de los oligonucleótidos puede servir como “oligonucleótido corriente arriba”, es decir un cebador corriente arriba, mientras que el segundo oligonucleótido sirve como “oligonucleótido corriente abajo”, es decir cebador corriente abajo, en la reacción de amplificación. La localización en el genoma VIH (o la secuencia complementaria del mismo) con la que se pueden hibridar los dos oligonucleótidos comprendidos en dicho par según la invención, definirá conjuntamente la secuencia del ácido nucleico que se amplifica. La secuencia amplificada está localizada entre los “sitios de unión de cebador” dentro de la región de LTR del genoma VIH. Se ha encontrado que, utilizando un par de oligonucleótidos según la invención en una reacción de amplificación basada en la transcripción, se puede conseguir una amplificación precisa y fiable del ácido nucleico derivado de todos los subtipos de VIH conocidos actualmente.

Un par de oligonucleótidos lo más preferido según la invención consistirá en un primer cebador que comprende la SEQ ID NO 1 y un segundo cebador con la secuencia de SEQ ID NO 5. Para su uso en un método de amplificación

basado en transcripción, es preferible el oligonucleótido con la SEQ ID NO 9, en combinación con un oligonucleótido con la secuencia de SEQ ID NO 5.

5 Parte de los oligonucleótidos según la invención son particularmente adecuados para su uso como sonda en la detección de ácido nucleico amplificado con un par de oligonucleótidos según la invención. Cuando se utilizan como sonda, se puede incorporar en dichos oligonucleótidos una etiqueta detectable. Los oligonucleótidos según la invención que son especialmente adecuados como sonda consisten esencialmente en la secuencia:

SEQ ID 6: TCT GGT AAC TAG AGA TCC CTC

SEQ ID 7: TAG TGT GTG CCC GTC TGT ó

SEC ID 8: AGT GTG TGC CCG TCT GTT

10 equipadas con una etiqueta detectable. Un oligonucleótido lo más preferido en este sentido es un oligonucleótido con una secuencia tal como se representa en SEQ ID 6.

15 En la técnica se conocen varios restos de etiquetado. Dicho resto puede ser por ejemplo un compuesto radiactivo, una enzima detectable (por ej., peroxidasa de rábano de caballo (HRP)), un hapteno como biotina, o cualquier otra fracción capaz de generar una señal detectable como, por ejemplo, colorimétrica, fluorescente, quimioluminiscente o electroquimioluminiscente. También se pueden detectar híbridos entre oligonucleótidos según la invención y ácido nucleico diana (amplificado) a través de otros métodos conocidos entre los expertos en la materia.

20 Además se describen kits para la amplificación y detección de ácido nucleico de VIH. El uso de estos kits de ensayo permite la detección selectiva precisa y sensible de muestras que supuestamente contienen ácido nucleico derivado de VIH. Tales kits de ensayo pueden contener un par de oligonucleótidos tal como se usan en la invención y, opcionalmente, también un oligonucleótido según la invención que se puede utilizar como sonda para la detección del material amplificado. Por otra parte, el kit de ensayo puede contener reactivos de amplificación adecuados. Estos reactivos son por ejemplo las enzimas adecuadas para llevar a cabo la reacción de amplificación. Un kit, adaptado para su uso con NASBA, por ejemplo, puede contener cantidades adecuadas de transcriptasa inversa, RNasa H y ARN polimerasa T7. Dichas enzimas pueden estar presentes en el equipo en una solución tamponada, aunque se pueden proporcionar igualmente como una composición liofilizada, por ejemplo, partículas esféricas liofilizadas. Dichas partículas liofilizadas han sido descritas anteriormente en la solicitud PCT N° EP95/01268. El equipo puede estar equipado además con composiciones de tampón, adecuadas para llevar a cabo una reacción de amplificación. Dichos tampones se pueden optimizar para la técnica de amplificación en particular para la que esté destinado el equipo, así como para el uso con los oligonucleótidos en particular que se proporcionan en el equipo. En las técnicas de amplificación basadas en transcripción, como por ejemplo NASBA, dichos tampones pueden contener, por ejemplo, DMSO, que potencia la reacción de amplificación (tal como se describe en el documento WO99102818).

30 Por otra parte, se puede incluir en el kit un control interno como mecanismo de comprobación del procedimiento de amplificación y para prevenir que se produzcan resultados de ensayo negativos falsos como consecuencia de fallos en el procedimiento de amplificación. El uso de controles internos en las técnicas de amplificación basadas en la transcripción se describe en el documento WO9404706. Una secuencia de control óptima se selecciona para que no compita con el ácido nucleico diana en la reacción de amplificación. Los kits pueden contener también reactivos para el aislamiento de ácido nucleico de una muestra biológica antes de la amplificación. En el documento EP 389063 se describe un método adecuado para el aislamiento de ácido nucleico.

Breve descripción de las figuras

40 Figura 1

Productos de amplificación tras el manchado y detección por quimioluminiscencia potenciada obtenidos tras la amplificación en presencia (panel A) o ausencia (panel B) de ARN de VIH-1 utilizando los siguientes pares de cebadores. Banda 1: SEQ ID 9-SEQ ID 10, banda 2: SEQ ID 9-SEQ ID 5, banda 3: SEQ ID 10-SEQ ID 4, banda 4: SEQ ID 10-SEQ ID 5, banda 5: SEQ ID 3-SEQ ID 12.

45 Ejemplos

Ejemplo 1: Amplificación y detección de ARN genómico de VIH-1

Se aplicaron los siguientes procedimientos para amplificar y detectar ARN genómico de VIH-1 de muestras, tal como se describe en los siguientes ejemplos.

Preparación de muestra y aislamiento de ácido nucleico

50 Se llevó a cabo el aislamiento de ácidos nucleicos con según Boom et al., 1990, Journal of Clinical Micro-biology 28, 495-503 y la patente europea n° EP 0389063. Brevemente: se añadió un volumen de 200 µl de plasma agrupado de donantes sanos (negativos para HBsAg, anti-HIV y anti HCV) a 900 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 47 mM, pH 7,2, EDTA 20 mM, Triton X-100 al 1,2%, tiocianato de guanidina 4,7 M (GusSCN, Fluka, Buchs, Suiza)). Después de

remover en torbellino y del centrifugado (30 segundos, 13.000 rpm) se añadieron una serie de diluciones de ARN de VIH-1 subtipo B patrón, caracterizada y descrita por Layne et al., 1992, *Virology* 189, 695-714 o muestras VIH-1 positivas. Tras la adición de 50 µl de silicio activado (suspensión 0,4 g/ml en HCl 0,1 N), se incubó la suspensión durante 10 minutos a temperatura ambiente con removido en torbellino regular. Tras el centrifugado (30-60 segundos, 13.000 rpm), se lavó dos veces el conglomerado de silicio con 1 ml de tampón de lavado (GuSCN 5,25 M, Tris-HCl 50 mM, pH 6,4), seguido de dos lavados con etanol al 70% y una etapa de lavado con acetona. A continuación, se secó el conglomerado de silicio durante diez minutos en un bloque de calentamiento a 56°C. Se eluyeron los ácidos nucleicos en silicio añadiendo 50 µl de tampón de elución (Tris-HCl 1,0 mM, pH 8,5) y se incubaron a 56°C durante 10 minutos. A continuación, se tomaron 5 µl del eluato del conglomerado para su posterior uso en la reacción de amplificación. Se almacenó el resto del eluato a -70°C.

Amplificación NASBA

Se llevaron a cabo amplificaciones en un volumen de reacción de 20 µl compuesto de 10 µl de mezcla de cebador, 5 µl (aislado) de ácidos nucleicos y 5 µl de mezcla de enzimas. Se obtuvo la mezcla de cebador por reconstitución de una acusfera liofilizada en 50 µl de diluyente de acusfera, 51,6 µl de agua, 8,4 µl de KCl 2M y 5 µl de cada cebador (10 µM). A continuación, se removió en torbellino a fondo la mezcla antes de su uso. De esta primera mezcla de cebador, se añadieron 10 µl a 5 µl del ARN de VIH-1 (aislado) (patrón). Se incubó la mezcla durante 5 minutos a 65°C y después se incubó a 41°C durante otros 5 minutos. Después de estas incubaciones, se añadieron 5 µl de la mezcla de enzima y se incubó durante 5 minutos a 41°C. Se transfirieron los tubos a la zona de detección y se incubaron durante 90 minutos a 41°C. Después de la reacción de amplificación, se almacenaron los tubos a -20°C hasta su uso posterior.

La reacción de amplificación contenía los siguientes reactivos:

- 40 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 12 mM MgCl₂
- 70 mM KCl
- 15% v/v sulfóxido de dimetilo
- 5 mM ditioneitol
- 1 mM de cada trifosfato desoxinucleosida
- 2 mM de los nucleósidos rATP, rCTP, rUTP
- 1,5 mM rGTP
- 0,5 mM ITP
- 0,105 µg/µl BSA
- 0,08 unidades RNasaH
- 32 unidades, ARN polimerasa T7
- 6,4 unidades transcriptasa inversas de virus de mieloblastosis avícola (Seikagaku, EE.UU.)
- 0,2 µM de cada cebador
- 375 mM sorbitol
- 45,6 mM sacarosa
- 28,5 mM manitol
- 0,13 mM dextrano T40

40 Detección de los productos amplificados

A. Electroforesis de gel

Se analizó la presencia de productos amplificados utilizando un gel de agarosa (100 ml de Pronarose al 2% y 0,5 µg/ml de bromuro de etidio) y utilizando 1*TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0) como tampón de desplazamiento. Se llevó a cabo la electroforesis a 100 voltios durante aproximadamente 30 minutos. Se visualizaron las bandas manchadas con bromuro de etidio de los productos amplificados utilizando radiación UV. Se hibridó la mancha con sonda de biotina (3 µM) en una mezcla de hibridación (750 mM NaCl, 75 mM citrato sódico,

20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 6,7), 10* Denhardtts) incubando la mancha durante 4 horas a 50°C. Después de la hibridación se lavó la mancha dos veces durante 5 minutos a 50°C con NaCl 450 mM, citrato sódico 45 mM, pH 6,4 (2* SSPE) y solución de dodecil sulfato sódico al 1% (SDS) y una vez durante 10 minutos con 20 mM de Na₂HPO₄, pH 7,4, Na 360 mM, EDTA 2 mM y SDS al 0,1% a temperatura ambiente. A continuación, se incubó la mancha durante 30 minutos, con 2 µl de estreptavidina/solución de peroxidasa de rábano de caballo (500 U/ml del equipo de detección por quimioluminiscencia potenciada de Amersham Life Science) en 10 ml de Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 900 mM, EDTA 5 mM, pH 7,4 y SDS al 0,5%. Después de los lavados, respectivamente dos veces durante 5 minutos en 2*SSPE, SDS al 0,1% y una vez durante 10 minutos en 2*SSPE a temperatura ambiente, se secó la mancha entre tejidos, se reveló y se expuso a una película según el protocolo de equipo de Amersham.

5

10 B. Hibridación de sonda por electroquimioluminiscencia (ECL)

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

15

20

Ejemplo 2: Amplificación y detección de ARN genómico de VIH-1

Se sometieron a ensayo los siguientes pares de cebadores en 10⁴ copias (tal como se determina por espectrofotometría a 260 nm) del patrón ARN de VIH-1. Se añadió el ARN directamente en la amplificación. Se llevó a cabo el análisis de los productos amplificados por electroforesis en gel tal como se ha descrito en el ejemplo 1. En la figura 1 se muestran los resultados.

25

Todos los pares de cebadores y sondas de la presente invención fueron capaces de amplificar y detectar ARN de VIH-1 de subtipo B en un grado similar. Se muestra la sensibilidad analítica para dos pares de cebadores (SEQ ID 9/SEQ ID 5 y SEQ ID 11/SEQ ID 5) utilizando una serie de dilución del patrón ARN de VIH-1 que tiene una concentración inicial de 5,5*10⁹ copias /ml. Se llevó a cabo la detección con sondas que tenían las secuencias representadas en SEQ ID 7 y SEQ ID 6. Se llevó a cabo la amplificación y detección tal como se ha descrito en el ejemplo 1. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos con ambos pares de cebadores.

30

TABLA 1

Copias ARN VIH-1	SEQ ID 3-SEC ID 5		SEQ ID 9-SEQ ID 5	
	N° detectado	% detectado	N° detectado	% detectado
200	4:4	100%	4:4	100%
100	8:8	100%	8:8	100%
50	8:8	100%	8:8	100%
25	7:8	87,5 %	7:8	87,5 %
12	6:8	75%	4:8	50%
6	2:8	25%	4:7	57%
3	0:8	0%	2:7	28,5 %
0	0:8	0%	0:7	0%

Ambos pares de cebadores tienen aproximadamente la misma sensibilidad para el patrón ARN de VIH-1, respectivamente, un índice de detección de 70% para el par de cebador SEQ ID 9/SEQ ID 5 y un índice de detección de 63% para el par cebador SEQ ID 3/SEQ ID 5.

35

Ejemplo 3: Amplificación y detección de ARN de VIH-1 en presencia de un control interno

En este ejemplo, se sometió a ensayo el par cebador SEQ ID 9/SEQ ID 5 y una sonda con la secuencia SEQ ID 7 en una serie de dilución del patrón ARN VIH-1 en presencia de un control interno (ic-)ARN. El ic-ARN es un transcrito

5 in vitro que contiene parte de la secuencia LTR de HXB-2 de VIH-1 y se añaden 10⁴ copias (tal como se determina por espectrofotometría a 260 nm) antes del aislamiento de ácidos nucleicos. Se llevó a cabo el aislamiento, la amplificación y la detección ECL tal como se ha descrito en el ejemplo 1. Con fines comparativos, se llevó a cabo una amplificación y detección por separado utilizando un par de cebador localizado en la región gag de VIH-1 (P1/P2) anteriormente descrita por Van Gemen et al., 1993, Journal of Virological Methods 43, 177-188. Las sondas utilizadas para detectar los productos de amplificación generados por el par de cebador basado en gag fueron:

Sonda de biotina: 5'-TGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGA

Sonda ECL: 5'-GAATGGGATAGAGTGCATCCAGTG

En la tabla 2 se muestran los resultados.

10 TABLA 2

ARN VIH-1 Copias /200µl	SEQ ID 9-SEQ ID 5 LTR		GAG P1/P2	
	N° detectado	% detectado	N° detectado	% detectado
320	9:10	90%	n.e.*	n.e.*
160	5:10	50%	8:10	80%
80	5:10	50%	5:10	50%
40	3:8	38%	4:10	40%
20	3:10	32%	1:10	10%
10	1:10	10%	2:10	20%
0	0:5	0%	1:5	20%

* n.e. significa no ensayado

Tanto el par de cebadores LTR de este ejemplo como el par de cebadores gag fueron capaces de detectar una cantidad similar de ARN VIH-1 en un ensayo controlado por un ARN producido in vitro que fue añadido antes del aislamiento de ácidos nucleicos.

15 Ejemplo 4: Detección de ARN VIH-1 en muestras VIH-1 positivas

20 En este ejemplo, se analizaron 40 muestras VIH-1 positivas de varias localizaciones geográficas para detectar la presencia de ARN de VIH-1. Se aislaron todas las muestras a través del método de aislamiento de ácidos nucleicos descrito en el ejemplo 1. Se llevó a cabo la amplificación y detección tal como se ha descrito en el ejemplo 1 utilizando un par cebador SEQ ID 9/SEQ ID 5 y sonda con la secuencia SEQ ID 7 o sonda con la secuencia de SEQ ID 8.

Con fines comparativos, se llevó a cabo la amplificación y detección por separado utilizando el par cebador gag y sondas tal como se ha descrito en el ejemplo 3. Se detectó la presencia de productos amplificados por hibridación de sonda ECL con arreglo al método del ejemplo 1. En la tabla 3 se muestran los resultados.

TABLA 3

Par cebador	Sonda ECL	N° detectado	% detectado
SEQ ID 9/SEQ ID 5 (LTR)	SEQ ID 7	40/40	100%
SEQ ID 9/SEQ ID 5 (LTR)	SEQ ID 8	10/10	100%
P1/P2 (gag)		29/40	72,5 %

25 Las dos combinaciones de sonda - cebador derivadas de la región LTR del VIH-1 descritas en este ejemplo fueron capaces de detectar VIH-1 de todas las muestras sometidas a ensayo. En contraste, la combinación de la sonda -

cebador del ensayo *gag* no detectó ARN genómico de VIH-1 de un gran número de muestras.

Ejemplo 5: Amplificación y detección de ARN de VIH-1 con subtipos definidos

5 En este ejemplo, se sometieron a ensayo 33 muestras que contenían ARN de VIH-1 de subtipos de tipo envuelta conocidos. Las muestras se originan de virus subtipificados propagados en cultivos celulares. Se clavaron muestras de sobrenadantes de cultivo celular de ambas variantes de los subtipos del grupo M de A a H y las variantes del grupo O en un plasma humano VIH-1 negativo y se trataron con arreglo al método del ejemplo 1. Se llevó a cabo la amplificación y detección como en el ejemplo 4 esencialmente. En la tabla 4 se muestran los resultados como un número de muestras de cada tipo del que se detectó ARN VIH-1 del número total de cada tipo ensayado.

TABLA 4

Par cebador	Tipos VIH-1									
	A	B	C	D	E	F	G	H	O	Total
SEQ ID 9/SEQ ID 5 (LTR)	5:5	2:2	2:2	5:5	7:7	1:1	1:1	1:1	9:9	33:33
	4:5	2:2	2:2	5:5	6:7	1:1	1:1	1:1	0:9	22:33

10 Se detectó ARN VIH-1 de las 33 muestra VIH-1 utilizando el par cebador LTR SEQ ID 9/SEQ ID 5 y la sonda con la secuencia SEQ ID 7. En contraste, el ensayo en el que se usó la combinación de sondas cebador *gag* tal como se ha descrito en el ejemplo 3 no sirvió para detectar el subtipo A y el subtipo E de cada una de las muestras y todas las muestras que contenían ARN VIH-1 de los miembros del grupo O.

15 Ejemplo 6: Amplificación y detección de muestras clínicas de VIH-1

20 En este ejemplo, se sometieron a ensayo 7 muestras obtenidas de pacientes seropositivos originarioa de África, Sudamérica y Asia para determinar la presencia de ARN genómico VIH-1. A pesar del hecho de que las muestras de sangre de estos enfermos son positivos a anticuerpo anti-p24 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) y la mancha de Western (Genelabs), se puntuaron todos los especímenes negativos mediante el ensayo QL ARN VIH-1 NASBA (Organon Teknika BV) en el que se emplea la combinación de sonda par cebador *gag* del ejemplo 3 y solamente se detectó una muestra única (R9612222) y se determinó cuantitativamente (29.500 copias de ARN /ml) mediante el ensayo Quantiplex ARN VIH-1 2,0 (Chiron) utilizando un volumen de muestra de 50 µl. En contraste, utilizando un volumen de muestra igual, el par de cebador SEQ ID 9/SEQ ID 5 y la sonda con la secuencia SEQ ID 7 detectaron cuatro de cada siete muestras (Tabla 5).

25 TABLA 5

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

30 Las muestras perdidas por la combinación de sonda cebador LTR no se detectan debido a una carga vírica baja por debajo del nivel de detección, ya que al usar un volumen de muestra de 1 ml, el ensayo Quantiplex ARN VIH-1 2,0 (Chiron) determinó cuantitativamente niveles de ARN VIH-1 de 30 o por debajo de 30 copias de ARN VIH-1 por cada 50 µl de estas muestras.

SECUENCIAS

- SEQ ID 1: P1.1 sin promotor: G GGC GCC ACT GCT AGA GA
- 5 SEQ ID 2: P1.2 sin promotor: G TTC GGG CGC CAC TGC TAG A
- SEQ ID 3: extremo U5 sin promotor: CGGGCGCCACTGCTA
- SEQ ID 4: P2.1: CTG CTT AAA GCC TCA ATA AA
- 10 SEQ ID 5: P2.2: CTC AAT AAA GCT TGC CTT GA
- SEQ ID 6: HIV-1 LTR-bio: TCT GGT AAC TAG AGA TCC CTC
- 15 SEQ ID 7: HIV-LTR-AMN1: TAG TGT GTG CCC GTC TGT.
- SEQ ID 8: HIV-LTR-AMN2: AGT GTG TGC CCG TCT GTT.
- SEQ ID 9: P1.1: *aat tct aat acg act cac tat agg gAG* AGG GGC GCC ACT GCT AGA GA
- 20 SEQ ID 10:P1.2: *aat tct aat acg act cac tat agg gAG* AGG TTC GGG CGC CAC TGC TAG A
- SEQ ID 11: U5 end: *aat tct aat acg act cac tat agg gCGGGCGCCACTGCTA*
- 25 SEQ ID 12: 5' LTR-Sph1: GAT GCA TGC TCA ATA AAG CTT GCC TTG AGT

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) AUTOR DE LA SOLICITUD
- (A) NOMBRE: AKZO NOBEL PHARMA
 (B) CALLE: Velperweg 76
 (C) CIUDAD: Amhem
 10 (D) PAÍS: Países Bajos
 (E) CÓDIGO POSTAL (C.P.): 6824 BM
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Secuencias de ácido nucleico que se pueden utilizar como cebadores y sondas en la amplificación y detección de todos los subtipos de VIH-1.
 15
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 12
- (iv) SOPORTE INFORMÁTICO:
- 20 (A) TIPO MEDIO: disquete
 (B) ORDENADOR: PC compatible IBM
 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 (D) PROGRAMA INFORMÁTICO: Patentin edición #1.0, versión #1.25 (EPO)
- 25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°1:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- 30 (A) LONGITUD: 18 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) HEBRA: única
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN
 35
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 1:

GGGCGCCACT GCTAGAGA

18

- 40 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°2:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- 45 (A) LONGITUD: 20 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) HEBRA: única
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN
 50
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 2:

GTTCGGGCGC CACTGCTAGA

20

- 55 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N° 3:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- 60 (A) LONGITUD: 15 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) HEBRA: única
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N° 3:

CGGGCGCCAC TGCTA

15

5

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N° 4:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 4:

CTGCTTAAAG CCTCAATAAA

20

20

- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°5:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 5:

CTCAATAAAG CTTGCCTGA

20

35

- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°6:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 6:

TCTGGTAACT AGAGATCCCT C

21

50

- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°7:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

55

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N° 7:

TAGTGTGTGC CCGTCTGT

18

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N° 8:

AGTGTGTGCC CGTCTGTT

18

20 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 47 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 9:

AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGAGG GCGCCASCTG CTAGAGA

47

35 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 49 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N° 10:

AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGAGG TTCGGGCGCC ACTGCTAGA

49

50 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 11:

AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGCGGGC GCCACTGCTA

40

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°: 12:

GATGCATGCT CAATAAAGCT TGCCTTGAGT

30

20

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección de ácido nucleico VIH-1 en una muestra en donde la muestra está sometida a una reacción de amplificación de ácido nucleico basada en la transcripción usando un par de oligonucleótidos como cebadores y reactivos adecuados de amplificación, y se detecta la presencia de cualquier ácido nucleico amplificado, en donde el par de oligonucleótidos consiste en:

un primer oligonucleótido que tiene 26-50 nucleótidos de longitud y que comprende la SEQ ID:1:

G GGC GCC ACT GCT AGA GA

y un segundo oligonucleótido que tiene 15-26 de longitud y que comprende al menos un fragmento de 10 nucleótidos de SEQ ID:5:

CTC AAT AAA GCT TGC CTT GA

en donde el primer oligonucleótido está unido operablemente a una secuencia promotora para uso como un cebador promotor.

2. Método según la reivindicación 1, en donde los reactivos de amplificación adecuados son transcriptasa inversa, RNasa H y ARN polimerasa T7

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en donde la detección de cualquier ácido nucleico amplificado se realiza haciendo reaccionar la muestra con uno o más oligonucleótidos seleccionados del grupo:

SEQ ID 6: TCT GGT AAC TAG AGA TCC CTC

SEQ ID 7: TAG TGT GTG CCC GTC TGT ó

SEQ ID 8: AGT GTG TGC CCG TCT GTT

uno o más de los cuales están provistos de una etiqueta detectable en condiciones de hibridación adecuadas y detectándose la presencia de la etiqueta en cualquier híbrido formados entre la secuencia amplificada y la sonda.

Productos de amplificación tras el manchado y detección por quimioluminiscencia potenciada.

FIGURA 1

