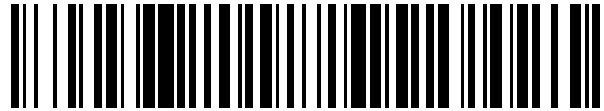


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 050**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2005 E 05815710 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 1833985**

54 Título: **Detección del virus del papiloma humano (VPH) usando sondas de ácidos nucleicos, microperlas y clasificadores celulares activados por fluorescencia (FACS)**

30 Prioridad:

10.12.2004 AU 2004907070
03.08.2005 US 704974 P

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

03.12.2014

73 Titular/es:

GENERA BIOSYSTEMS LIMITED (100.0%)
1 DALMORE DRIVE
SCORESBY, VICTORIA 3179, AU

72 Inventor/es:

POETTER, KARL y
GOULD, TOBY

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 524 050 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detección del virus del papiloma humano (VPH) usando sondas de ácidos nucleicos, microperlas y clasificadores celulares activados por fluorescencia (FACS)

5 **Antecedentes de la invención**

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere en general al campo de los ensayos de diagnóstico y detección. Más en particular, la presente invención proporciona métodos y reactivos que incluyen biochips para detectar la presencia de, o distinguir entre, uno o más analitos en una muestra.

Descripción de la técnica anterior

15 Los detalles bibliográficos de la bibliografía proporcionada en la memoria descriptiva objeto se enumeran al final de la memoria descriptiva.

20 La referencia a cualquier técnica anterior en esta memoria descriptiva no es, y no debería considerarse como, un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en cualquier país.

25 La necesidad de métodos de examen rápidos y fiables para detectar múltiples analitos en un ensayo individual es vital no sólo en los campos de la diagnosis clínica, sino también para su uso en el examen, por ejemplo, para el examen de toxinas ambientales y de fármacos.

30 Una de tales áreas que necesita urgentemente métodos y reactivos de examen mejorados es el campo de las enfermedades infecciosas. Por ejemplo, una estimación conservadora del uso mundial de pruebas diagnósticas para enfermedades de transmisión sexual, tales como el virus del papiloma humano (VPH), es aproximadamente de 20.000.000 de pruebas al año.

35 Muchas de las pruebas existentes para examinar las causas de enfermedades infecciosas requieren mucho tiempo, son laboriosas, caras, a menudo son específicas sólo para un patógeno específico y/o no pueden diferenciar entre diferentes cepas de patógenos.

40 El VPH es el principal patógeno causante de cáncer de cuello uterino. Sin embargo, el taxón del VPH comprende muchas "cepas" del patógeno, de las cuales sólo algunas están asociadas con el desarrollo de cáncer de cuello uterino y otros carcinomas. Por consiguiente, las cepas del VPH se clasifican típicamente como cepas de "alto riesgo", incluyendo las 13 cepas que representan aproximadamente el 98 % de los casos de cáncer de cuello uterino, o cepas de "bajo riesgo" que no están asociadas típicamente con el desarrollo de cáncer de cuello uterino.

45 Actualmente, el cáncer de cuello uterino se detecta mediante un frotis de Papanicolau. En esta técnica, se recogen células del cuello uterino mediante raspado o lavado. Estas células se colocan después sobre un portaobjetos de microscopio de vidrio para producir el "frotis". Después, un patólogo examina el portaobjetos, buscando células aberrantes. El frotis de Papanicolau, sin embargo, es un ensayo algo insatisfactorio para determinar inequívocamente el riesgo de cáncer de cuello uterino, ya que la técnica tiene una tasa de falsos negativos de aproximadamente el 20 % y la técnica no puede distinguir un taxón de "alto riesgo" y de "bajo riesgo".

50 Los documentos KR 20040083674 y WO 03054149 enseñan métodos para analizar el genotipo del VPH basándose en perlas microesféricas LabMAP, donde las sondas se acoplan a las perlas y las perlas se identifican basándose únicamente en fluorescencia.

55 El documento WO 02/40698 desvela análisis múltiple de factores solubles mediante citometría de flujo en los cuales micropartículas de activación y micropartículas de detección forman complejos con factores solubles y los complejos se detectan y cuantifican.

60 El documento WO 2004/018500 desvela portadores de ácidos nucleicos sólidos o semisólidos codificados para uso en la multiplexación de reacciones basadas en ácidos nucleicos de fase sólida, y un método para identificar una molécula de ácido nucleico que tiene una característica definida dentro de una población de dos o más moléculas de ácido nucleico diferentes.

65 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un ensayo de detección que puede detectar un analito en una muestra y/o diferenciar un número de analitos diferentes. Además, los reactivos y métodos de la presente invención descritos en este documento son relativamente rápidos y económicos comparados con algunos ensayos de detección existentes.

Sumario de la invención

A lo largo de toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que vienen a continuación, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra “comprender”, y variaciones tales como “comprende” y “que comprende”, se entenderá que implican la inclusión de un número entero o etapa o un grupo de números enteros o etapas establecidos pero no la exclusión de algún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Se hace referencia a las secuencias de nucleótidos y aminoácidos mediante un número identificador de secuencia (SEQ ID NO:). Los SEQ ID NO: corresponden numéricamente a los identificadores de secuencia <400>1 (SEQ ID NO:1), <400>2 (SEQ ID NO:2), etc. En la tabla 1 se proporciona un resumen de los identificadores de secuencia. Después de las reivindicaciones se proporciona un listado de secuencias.

La presente invención proporciona ensayos que permiten la detección de uno o más analitos y/o que diferencian entre miembros dentro de una clase de analitos. En particular, se emplea análisis de multiplexación basado en las propiedades de los analitos y de los componentes del ensayo para identificar o distinguir entre analitos.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona un conjunto de perlas para detectar uno o más analitos y/o para diferenciar entre dos o más miembros dentro de una clase de analitos, en el que el conjunto de perlas comprende una pluralidad de subconjuntos de perlas en los que:

- (a) las perlas de cada subconjunto son homogéneas con respecto al tamaño;
- (b) las perlas dentro de cada subconjunto se acoplan a un reactante que reaccionará específicamente con un analito de interés dado en una muestra que se va a probar;
- (c) el reactante en cada perla se marca con la misma marca con cada subconjunto de perlas que tienen una intensidad fluorescente diferente para crear una mezcla heterogénea de subconjuntos de perlas basándose en la intensidad fluorescente; y
- (d) se mezclan entre sí al menos dos subconjuntos de perlas para producir un conjunto de perlas, en el que la identidad del subconjunto y, por lo tanto, el reactante al que se ha acoplado la perla es identificable por citometría de flujo basándose en el tamaño, la intensidad fluorescente y la discriminación de analitos.

En otro aspecto, la presente invención contempla un método para detectar y/o diferenciar entre dos o más analitos en una muestra, que comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto la muestra con un conjunto de perlas específico para los analitos de interés;
- (b) incubar dicho conjunto de perlas con dicha muestra durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir que dicho(s) analito(s) en dicha muestra reaccione(n) específicamente con un reactante en una perla dentro de dicho conjunto de perlas; y
- (c) detectar y/o diferenciar los analitos en la muestra que se unen a un reactante en dicha perla.

En un aspecto relacionado, los reactantes se pueden marcar con uno o más fluorocromos que además permiten la diferenciación entre miembros dentro de una clase de analitos. En un aspecto preferido, la presente invención proporciona métodos y conjuntos de perlas que pueden detectar y/o distinguir entre analitos dentro de una muestra biológica, en los que los analitos son específicos para un patógeno infeccioso.

Las muestras biológicas contempladas en este documento incluyen sangre, suero, saliva, heces, orina, fluido tisular, semen, exudado, pus, fluido respiratorio y mucosidad y empapadores procedentes de llagas, cánceres y lesiones tópicas.

El término “patógeno” se refiere a un microorganismo o virus que infecta o coloniza una muestra. Los patógenos ejemplares incluyen virus, bacterias, hongos y microorganismos eucariotas. Un virus incluye un lentivirus (por ejemplo, el virus del SIDA, HIV-I, HIV-II, HTLV-IV), retrovirus y el virus de la gripe aviar. En una realización preferida, “patógeno” incluye un microorganismo o virus que infecta a un organismo multicelular tal como un animal o una planta. Por consiguiente, en una realización, el analito puede considerarse como un patógeno de animal o planta. Sin embargo, la presente invención engloba la detección y/o diferenciación de entidades no patogénicas que colonizan organismos multicelulares tales como simbiontes, endófitos, colonizadores gastrointestinales y similares. Los métodos de la presente invención también son aplicables a la detección de analitos en una muestra que son indicativos de la presencia de agentes terapéuticos o drogas. Los métodos y reactivos de la presente invención también pueden usarse en la detección de un analito en una muestra que no se deriva de una muestra biológica aislada de un animal o una planta. Como tales, los reactivos y métodos de la presente invención también se extienden a la detección de uno o más analitos y/o la diferenciación entre analitos en muestras ambientales, incluyendo muestras de aire, agua y tierra, incluyendo tierra extraterrestre, polvo y similares, muestras industriales y

similares, además de las muestras biológicas enumeradas anteriormente.

5 En una realización particular, la presente invención prevé métodos de diagnóstico y reactivos para VPH en sujetos humanos y puede detectar y diferenciar entre diferentes cepas con el fin de distinguir un taxón del VPH de "alto riesgo" de un taxón del VPH de "bajo riesgo". Por consiguiente, en una realización particularmente preferida, la presente invención proporciona conjuntos de perlas que pueden distinguir entre pluralidades de cepas del VPH diferentes. Como tales, en un aspecto, los análisis son específicos para una pluralidad de taxones del VPH y los métodos y reactivos son específicos para la detección de ácido nucleico o antígenos o anticuerpos que son específicos para la pluralidad de taxones del VPH.

10 En una realización incluso más particular, cebadores o sondas de ácidos nucleicos capaces de unirse a una porción específica de una cepa de un genoma del VPH se inmovilizan sobre perlas en cada subconjunto de perlas. Después se usan cebadores dirigidos a regiones conservadas dentro de un genoma del VPH que flanquean una región específica de una cepa para amplificar el genoma del VPH. Después se usan subconjuntos de perlas específicos de una cepa cualquiera del VPH para detectar o distinguir la cepa del VPH.

15 Por tanto, otro aspecto de la presente invención está dirigido a un conjunto de perlas para detectar una o más cepas del VPH y/o para diferenciar entre dos o más cepas del VPH, en el que el conjunto de perlas comprende una pluralidad de subconjuntos de perlas en los que:

20 (a) las perlas de cada subconjunto son homogéneas con respecto al tamaño;

(b) las perlas dentro de cada subconjunto se acoplan a una sonda de captura de ácido nucleico que puede unirse a una región específica de una cepa del VPH de un genoma del VPH;

25 (c) la sonda de captura en cada perla se marca con la misma marca con cada subconjunto de perlas que tiene una intensidad fluorescente diferente para crear una mezcla heterogénea de perlas basándose en la intensidad fluorescente; y

30 (d) se mezclan entre sí al menos dos subconjuntos de perlas para producir un conjunto de perlas, en el que la identidad del subconjunto y, por lo tanto, la cepa del VPH es identificable por citometría de flujo basándose en el tamaño, la intensidad fluorescente y la discriminación de secuencias.

35 Otro aspecto de la presente invención contempla un método para detectar y/o diferenciar entre dos o más cepas del VPH en una muestra, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto la muestra con un conjunto de perlas que comprende una pluralidad de subconjuntos de perlas en los que:

40 (i) las perlas de cada subconjunto son homogéneas con respecto al tamaño; t

(ii) las perlas dentro de cada subconjunto se acoplan a una sonda de captura de ácido nucleico que puede unirse a una región específica de una cepa del VPH de un genoma del VPH;

45 (iii) la sonda de captura en cada perla se marca con la misma marca con cada subconjunto de perlas que tiene una intensidad fluorescente diferente para crear una mezcla heterogénea de perlas basándose en la intensidad fluorescente; y

50 (iv) se mezclan entre sí al menos dos subconjuntos de perlas para producir un conjunto de perlas, en el que la identidad del subconjunto y, por lo tanto, la cepa del VPH es identificable por citometría de flujo basándose en el tamaño, la intensidad y la discriminación de secuencias;

55 (b) incubar dicho conjunto de perlas con dicha muestra durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir que dicha(s) sonda(s) se unan con el genoma del VPH amplificado para generar un replicón que comprende una región específica de una cepa;

(c) detectar y/o diferenciar los amplicones generados en la muestra que se unen a dichas perlas para identificar o distinguir así entre las dos o más cepas del VPH.

60 En un aspecto preferido, las perlas dentro de los conjuntos de perlas son distinguibles basándose en el tamaño, el nivel de intensidad fluorescente, el tipo de fluorocromo y el reactante que puede reaccionar con un analito específico.

65 El método de la presente invención en relación con la detección del VPH puede usarse para distinguir de entre 2 y 16 cepas del VPH incluyendo entre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 cepas. En una realización particularmente preferida, el conjunto de perlas comprende al menos 16 subconjuntos de perlas para las cepas del

VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. Las sondas de captura adecuadas son las enumeradas en la figura 9 y representadas en los SEQ ID NO: 5 a 20.

5 La determinación de si se ha producido unión entre un analito y un reactante presente en una perla puede realizarse usando cualquier metodología que permita la diferenciación entre diferentes perlas dentro de un conjunto de perlas. En una realización particularmente preferida, el método de diferenciar entre diferentes perlas dentro de los conjuntos de perlas es la citometría de flujo.

10 La presente invención además contempla kits de diagnóstico para su uso de acuerdo con los reactivos y métodos de la presente invención. En particular, la presente invención se extiende a biochips y la miniaturización de los componentes de fase sólida del ensayo para generar reactivos de nanoensayo. En una realización el conjunto de perlas o parte del mismo u otros reactivos se inmovilizan en una fase sólida tal como un biochip. El biochip también puede considerarse como un "biolaboratorio" en el que se realiza al menos parte del ensayo y/o se registran los resultados.

15

En la tabla 1 se proporciona una lista de abreviaturas usadas en este documento.

Tabla 1 - Abreviaturas

Abreviatura	Descripción
FITC	Fluoresceína
HEX	Hexaclorofluoresceína
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del papiloma humano
JOE	7'-dimetoxifluoresceína
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PMT	Tubo fotomultiplicador
QD	Punto cuántico
TAMRA	Carboxitetrametilrodamina
TET	Tetraclorofluoresceína
TMR	Tetrametilrodamina
VRE	Enterococos resistentes a la vancomicina

20 En la tabla 2 se muestra un resumen de los identificadores de secuencia usados en este documento.

Tabla 2 - Identificadores de secuencia

Identificador de secuencia	Secuencia
SEQ ID NO:1	GP5+ secuencia de nucleótido cebador
SEQ ID NO:2	GP6+ secuencia de nucleótido cebador
SEQ ID NO:3	secuencia de nucleótido cebador LC1_F
SEQ ID NO:4	secuencia de nucleótido cebador LC1_R
SEQ ID NO:5	Sonda de captura o cepa 6 del VPH
SEQ ID NO:6	Sonda de captura o cepa 11 del VPH
SEQ ID NO:7	Sonda de captura o VPH 31
SEQ ID NO:8	Sonda de captura o VPH 33
SEQ ID NO:9	Sonda de captura o VPH 35
SEQ ID NO:10	Sonda de captura o VPH 39
SEQ ID NO:11	Sonda de captura o VPH 45
SEQ ID NO:12	Sonda de captura o VPH 51

SEQ ID NO:13	Sonda de captura o VPH 52
SEQ ID NO:14	Sonda de captura o VPH 56
SEQ ID NO:15	Sonda de captura o VPH 58
SEQ ID NO:16	Sonda de captura o VPH 59
SEQ ID NO:17	Cebador de sonda 68 VPH sintético
SEQ ID NO:18	Sonda de captura o VPH 31
SEQ ID NO:19	Sonda de captura o VPH 31
SEQ ID NO:20	Sonda de captura o VPH 31
SEQ ID NO:21	Cebador MLC1_Ac VPH sintético
SEQ ID NO:22	Cebador GP5+ For_Ac VPH sintético
SEQ ID NO:23	Cebador MLC1_reg_FP VPH sintético
SEQ ID NO:24	Cebador MLC1_reg_R VPH sintético
SEQ ID NO:25	Cebador GP5d+ VPH sintético
SEQ ID NO:26	Cebador GP6d+ VPH sintético

Breve descripción de las figuras

- 5 La figura 1 es una representación gráfica que representa un citómetro de flujo típico.
- La figura 2 es una representación gráfica que muestra un esquema del protocolo de extracción de ADN usado en el método de diagnóstico del VPH.
- 10 La figura 3 es una representación gráfica que muestra el protocolo de PCR usado para amplificar el VPH y el ADN humano a partir de una muestra de ADN. GP5+ y GP6+ se refieren a cebadores de VPH universales que se unen a secuencias conservadas (Y) en el VPH y generan un amplicón que comprende una región que es variable entre cepas del VPH (X₁₋₁₆). Los cebadores LC1_F y LC1_R amplifican una región del ADN genómico humano (Z) que sirve como control en las etapas de hibridación posteriores. Los cebadores GP6+ y LCR_R comprenden una marca fluorescente que se incorpora dentro del amplicón generado.
- 15 La figura 4 es una representación gráfica que muestra la diferenciación de microesferas basándose en el tamaño. Se muestran seis grupos que corresponden a microesferas que comprenden diámetros de 3,0 µm, 3,5 µm, 4,1 µm, 5,0 µm, 5,6 µm y 6,8 µm.
- 20 La figura 5 es una representación gráfica que muestra la diferenciación de microesferas del mismo tamaño basándose en la intensidad de marca fluorescente. Se pudieron distinguir claramente intensidades relativas de TMR del 0 %, 4 %, 20 % y 100 %.
- 25 La figura 6 es un diagrama esquemático que muestra cada uno de los agentes de unión usados en la matriz. La matriz comprende microesferas que comprenden diámetros de 3,0 µm, 3,5 µm, 4,1 µm, 5,0 µm, 5,6 µm y 6,8 µm e intensidades de señal de marca fluorescente del 0 %, 4 %, 20 % y 100 %. En el caso de los tamaños de perlas más pequeños, es decir, 3,0 µm, 3,5 µm y 4,1 µm, se usaron intensidades de TMR del 0 % y 100 %; para las microesferas de 5,0 µm se usaron intensidades de TMR del 0 %, 20 % y 100 %; y para las microesferas más grandes, de 5,6 µm y 6,8 µm de diámetro, se usaron todas las intensidades de señal.
- 30 La figura 7 es una representación gráfica que muestra cómo se distinguieron 17 agentes de unión usando citometría de flujo basándose en el tamaño de partícula y la intensidad de marca fluorescente. Los grupos 1 a 4 corresponden a partículas de 6,8 µm con intensidades de marca del 0 %, 4 %, 20 % y 100 % respectivamente; los grupos 5 a 8 corresponden a partículas de 5,6 µm con intensidades de marca del 0 %, 4 %, 20 % y 100 % respectivamente; los grupos 9 a 11 corresponden a partículas de 5,0 µm con intensidades de marca del 100 %, 20 % y 0 % respectivamente; los grupos 12 y 13 corresponden a partículas de 4,1 µm con intensidades de marca del 100 % y 0 % respectivamente; los grupos 14 y 15 corresponden a partículas de 3,5 µm con intensidades de marca del 100 % y 0 % respectivamente; los grupos 16 y 17 corresponden a partículas de 3,0 µm con intensidades de marca del 0 % y 100 % respectivamente.
- 35 La figura 8 es una representación gráfica que muestra a qué matriz de agentes de unión se ha unido un amplicón. Los resultados muestran la unión a la secuencia conservada vírica, Y, la secuencia de control humano Z y la secuencia específica de una cepa vírica X₁₆.
- 40

La figura 9 es una representación de sondas de captura (cebadores) específicas para las cepas del VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68.

- 5 Las figuras 10A a G proporcionan Qplots (marca registrada) de muestras humanas que detectan la presencia o ausencia del VPH.

Descripción detallada de la invención

- 10 La presente invención proporciona ensayos y reactivos que incluyen biochips que permiten la detección de uno o más analitos y/o diferenciar entre miembros dentro de una clase de analitos. En particular, los analitos se identifican o distinguen mediante un método de análisis de multiplexación basado en las propiedades de los analitos y de los componentes del ensayo. Los ensayos de diagnóstico y detección y los reactivos de la presente invención tienen aplicación particular en la diagnosis de infecciones por patógenos en sujetos eucariotas multicelulares. En una
15 realización particular, la presente invención proporciona un ensayo de diagnóstico para el VPH en sujetos humanos y puede diferenciar entre taxones del VPH con el fin de distinguir infecciones por VPH de "alto riesgo" de infecciones por VPH de "bajo riesgo". Además, la presente invención también proporciona un método de diagnóstico o evaluación del riesgo de desarrollo de una enfermedad asociada con una infección por un analito en un sujeto eucariota multicelular incluyendo, entre otras, cáncer de cuello uterino en un sujeto humano.

- 20 Ha de entenderse que a menos que se indique otra cosa, la invención objeto no está limitada a protocolos de diagnóstico o ensayo específicos, ya que estos pueden variar. También ha de entenderse que la terminología usada en este documento es con el fin de describir realizaciones particulares solamente y su intención no es limitativa.

- 25 Cabe destacar que, tal como se usa en la memoria descriptiva objeto, las formas del singular "un", "uno" y "el" incluyen aspectos plurales a menos que el contexto ya establezca otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "un analito" incluye un único analito así como dos o más analitos; un "sustrato distinguible fisicoquímicamente" incluye un único sustrato así como dos o más sustratos; y así sucesivamente.

- 30 Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona un conjunto de perlas que es capaz de detectar, y/o diferenciar entre dos o más analitos en una muestra, comprendiendo dicho conjunto de perlas:

(a) las perlas de cada subconjunto son homogéneas con respecto al tamaño;

- 35 (b) las perlas dentro de cada subconjunto se acoplan a un reactante que reaccionará específicamente con un analito de interés dado en una muestra que se va a probar;

- (c) el reactante en cada perla se marca con la misma marca con cada subconjunto de perlas que tiene una intensidad fluorescente diferente para crear una mezcla heterogénea de subconjuntos de perlas basándose en la
40 intensidad fluorescente; y

- (d) se mezclan entre sí al menos dos subconjuntos de perlas para producir un conjunto de perlas, en el que la identidad del subconjunto y, por lo tanto, el reactante al que se ha acoplado la perla es identificable por citometría de flujo basándose en el tamaño, la intensidad fluorescente y la discriminación de analitos.

- 45 En un aspecto relacionado, los reactantes pueden marcarse diferencialmente para crear subpoblaciones adicionales de perlas basándose en la incorporación de diferentes fluorocromos.

- 50 En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos o conjuntos de perlas para la detección y/o diferenciación de un analito.

En un aspecto preferido, los métodos o conjuntos de perlas de la presente invención pueden detectar y/o diferenciar analitos patogénicos.

- 55 La presente invención también proporciona métodos para detectar y/o diferenciar entre uno o más analitos en una muestra que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto la muestra con un conjunto de perlas específico para los analitos de interés;

- 60 (b) incubar dicho conjunto de perlas con dicha muestra durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir que dicho (s) analito (s) en dicha muestra reaccione(n) específicamente con un reactante en una perla dentro de dicho conjunto de perlas; y

(c) detectar y/o diferenciar analitos en la muestra que se unen a un reactivo en dicha perla.

- 65 Tal como se usa en este documento, el término "analito patogénico" el término "analito patogénico" se refiere a un

microorganismo o virus que supuestamente infecta, coloniza o ha contaminado de otro modo la muestra. Los analitos de patógenos ejemplares incluyen virus, bacterias, hongos y microorganismos eucariotas. En una realización preferida, "analito" incluye un microorganismo o virus que infecta un organismo multicelular tal como un animal o una planta. Por consiguiente, en una realización el analito patológico puede considerarse como un patógeno de animal o de planta. Sin embargo, la presente invención engloba la detección y diferenciación de analitos no patogénicos que colonizan organismos multicelulares tales como simbioses microbianos de animales (por ejemplo, *Lactobacillus* spp., bacterias de rumiantes) , simbioses microbianos de insectos (por ejemplo, *Streptomyces* spp., *Wolbachia* spp.) , simbioses microbianos de esponjas (por ejemplo, algas verdes, dinoflagelados, cianobacterias) y similares; endófitos de plantas (por ejemplo, *Mycorrhiza*, *Rhizobium* spp., *Frankia* spp., *Streptomyces* spp.) ; y similares. Además, el analito puede ser un analito que no esté asociado con un organismo multicelular. Tales analitos incluyen bacterias, hongos, virus, protistas, nematodos y similares, que colonizan entornos particulares incluyendo entornos "naturales" tales como tierra, océanos, agua dulce, hielo, roca, fumarolas hidrotermales y aire; entornos sanitarios incluyendo hospitales, equipo hospitalario, equipo quirúrgico, prendas del personal sanitario y similares; entornos "industriales" incluyendo instalaciones de fabricación, instalaciones farmacéuticas, fábricas de cerveza, bodegas y similares; entornos de "laboratorio" incluyendo fermentadores, cultivos, mesas de laboratorio, equipo y similares.

Por consiguiente, las muestras contempladas por la presente invención incluyen muestras industriales tales como aire, agua y tierra y similares, y muestras biológicas tales como sangre, suero, saliva, heces, orina, fluido tisular, semen, exudado, pus, fluido respiratorio y mucosidad y empapadores procedentes de llagas, cánceres y lesiones tóxicas. Además, una muestra puede ser una muestra extraterrestre tal como de un meteorito o de otro planeta. En lo que respecta a esto último, el ensayo de la presente invención se puede adaptar para su uso en un vehículo remoto interplanetario para pruebas de muestras de tierra o polvo o hielo o para probar material de núcleo en un planeta.

En una realización preferida, el analito comprende una bacteria, hongo, virus y/o parásito eucariota que infecta un sujeto animal. Los "sujetos animales" contemplados en este documento incluyen cualquier animal, con preferencia un mamífero y con más preferencia un primate incluyendo un primate inferior y aún con más preferencia, un humano. Por conveniencia, un "animal" también incluye específicamente especies de ganado tales como reses, caballos, ovejas, cerdos, cabras y burros así como animales de laboratorio incluyendo ratones, ratas, conejos, cobayas y hámsteres.

Los analitos humanos ejemplares que pueden detectarse usando los reactivos y métodos de la presente invención incluyen virus tales como el virus del papiloma humano (VPH), coronavirus incluyendo el virus SARS, virus de la gripe, virus de la gripe aviar, VIH incluyendo VIH-1, VIH-II o HLTV-IV, lentivirus en general, virus de hepatitis y similares, los agentes patogénicos de enfermedades de transmisión sexual tales como clamidia, gonorrea, *Mycoplasma* spp. y sífilis; patógenos transmitidos por los alimentos tales como *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *E. coli* (en particular, *E. coli* HO 567), *Shigella* spp., *Brucella* spp., *Staphylococcus aureus*; patógenos nosocomiales tales como *S. aureus* incluyendo *S. Aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y enterococos incluyendo enterococos resistentes a la vancomicina (VRE) ; patógenos adquiridos ambientalmente tales como *Legionella* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *Bacillus anthracis* (antrax) y similares.

En un aspecto, la muestra en la que se detecta el analito es, con preferencia, una muestra derivada de un sujeto multicelular que está supuestamente infectado o colonizado por el analito. Por lo tanto, la muestra es, con preferencia, una "muestra biológica". Las muestras biológicas ejemplares que de ningún modo limitan la presente invención incluyen muestras de tejido o de células tales como raspados celulares, biopsias y similares y muestras de fluidos corporales incluyendo sangre, orina, linfa, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo y similares.

En otro aspecto, los métodos de la presente invención también son aplicables a la detección de un "analito" en una muestra que no se deriva exclusivamente de un organismo eucariota multicelular. Como tal, la presente invención se extiende a detectar, y/o diferenciar entre, uno o más taxones o cepas particulares de analitos en muestras tales como muestras ambientales (incluyendo muestras de aire, agua y tierra) , muestras industriales, muestras de laboratorio y similares. Por ejemplo, los métodos de la presente invención pueden usarse para evaluar la microflora procarionota, la microflora eucariota y o la carga vírica de una muestra de tierra, agua o aire o una muestra derivada de un objeto o superficie artificial.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, el analito que ha de detectarse es el VPH o una cepa del mismo y la muestra es, con preferencia, una muestra biológica derivada de un sujeto humano. En realización preferida adicional, la muestra biológica comprende una o más células del sujeto, sangre u orina. Con más preferencia, la muestra biológica comprende células del cuello uterino recogidas del sujeto.

El VPH se describe en detalle por Gearhart y col. (www.emedicine.com/MED/topic1037.htm, 2004), que se reproduce en parte a continuación. Los VPH producen tumores epiteliales de la piel y las membranas mucosas. Se han detectado más de 100 tipos de VPH, y se han secuenciado completamente los genomas de casi 70. El sistema de clasificación actual, que se basa en las similitudes en sus secuencias genómicas, se correlaciona generalmente con las 3 categorías usadas para describir el VPH clínicamente: anogenital y/o mucoso, cutáneo no genital, y

epidermodisplasia verruciforme (EV). En internet se dispone de una base de datos de secuencias genómicas del VPH y un árbol filogénico en la Base de datos de secuencias del VPH.

5 Las infecciones por VPH mucoso se clasifican además como latentes (asintomáticas), subclínicas o clínicas. Las lesiones clínicas son manifiestamente evidentes, mientras que las infecciones latentes sólo se detectan por pruebas de ADN vírico. Las lesiones subclínicas se identifican por la aplicación de ácido acético al 5 % y la inspección bajo aumento. La mayoría de las infecciones por VPH son latentes; las infecciones clínicamente evidentes normalmente tienen como resultado verrugas en lugar de tumores malignos.

10 Los tipos 6 y 11 del VPH se marcan típicamente como de bajo riesgo porque la infección con estos tipos tiene bajo potencial oncogénico y normalmente tiene como resultado la formación de condilomas y lesiones precancerosas de bajo grado. Los tipos 16 y 18 del VPH han resultado ser los tipos de alto riesgo del VPH porque son responsables de la mayoría de las lesiones intraepiteliales de alto grado que pueden evolucionar a carcinomas, en particular las de la categoría anogenital y/o mucosa.

15 La infección por VPH sola no causa transformación maligna del tejido infectado. En este proceso han estado implicados cofactores tales como el uso de tabaco, la radiación ultravioleta, el embarazo, la deficiencia de folato, y la supresión inmunitaria. La tabla 3 enumera una diversidad de enfermedades y los tipos del VPH asociados.

20 Tabla 3 - Enfermedades y subtipos del VPH asociados

Enfermedad cutánea no genital	Tipo de VPH
Verrugas comunes (verrucae vulgaris)	1, 2, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65
Verrugas plantares (myrmecias)	1, 2, 4, 63
Verrugas planas (verrucae plana)	3, 10, 27, 28, 38, 41, 49
Verrugas de carnicero (verrugas comunes de gente que manipula carne, carne de ave y pescado)	1, 2, 3, 4, 7, 10, 28
Verrugas en mosaico	2, 27, 57
Carcinoma de células escamosas ungueal	16
Epidermodisplasia verruciforme (benigna)	2, 3, 10, 12, 15, 19, 36, 46, 47, 50
Epidermodisplasia verruciforme (maligna o benigna)	5, 8, 9, 10, 14, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 37, 38
Lesiones cutáneas no verrugosas	37, 38
Enfermedad mucosa no genital	Tipo de VPH
Papilomatosis respiratoria	6, 11
Carcinoma de células escamosas del pulmón	6, 11, 16, 18
Papiloma laríngeo	6, 11, 30
Carcinoma laríngeo	16, 18
Papiloma del seno maxilar	57
Carcinoma de células escamosas de los senos	16, 18
Papilomas conjuntivos	6, 11
Carcinoma conjuntivo	16
Hiperplasia epitelial focal oral (enfermedad de Heck)	13, 32
Carcinoma oral	16, 18
Leucoplaquia oral	16, 18
Carcinoma de células escamosas del esófago	16, 18
Enfermedad anogenital	Tipo de VPH
Condilomas acuminados	6, 11, 30, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 54
Papulosis bowenoide	16, 18, 34, 39, 42, 45
Enfermedad de Bowen	16, 18, 31, 34
Condilomas gigantes (tumores de Buschke-Löwenstein)	6, 11

Neoplasia intraepitelial inespecífica	30, 34, 39, 40, 53, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69
Neoplasia intraepitelial de bajo grado	6, 11, 43
Neoplasia intraepitelial intermedia	31, 33, 35, 42, 44, 45, 51, 52
Neoplasia intraepitelial de alto grado	16, 18, 56, 58
Carcinoma de vulva	6, 11, 16, 18
Carcinoma de vagina	16
Carcinoma de cuello uterino	16, 18, 31
Carcinoma de ano	16, 31, 32, 33
Carcinoma in situ de pene (eritroplasia de Queyrat)	16
Carcinoma de pene	16, 18

Los papilomavirus son especies altamente específicas y no infectan otras especies, incluso bajo condiciones de laboratorio. Los seres humanos son el único reservorio conocido para el VPH.

- 5 Los papilomavirus son virus sin envoltura de simetría icosaédrica con 72 capsómeros que rodean un genoma que contiene ADN circular bicatenario con aproximadamente 8000 pares de bases.

10 Se cree que los papilomavirus tienen 2 modos de replicación, es decir, replicación estable del genoma episómico en células basales y replicación incontrolada, o vegetativa, en células más diferenciadas para generar el virus progenie. Aunque todas las células de una lesión contienen el genoma vírico, la expresión de genes víricos está estrechamente vinculada al estado de diferenciación celular. La mayoría de los genes víricos no se activan hasta que el queratinocito activado abandona la capa basal. La producción de partículas de virus sólo puede producirse en queratinocitos altamente diferenciados; por lo tanto, la producción de virus sólo se produce en la superficie epitelial donde las células se desprenden finalmente al entorno.

15 Se cree que las lesiones por VPH surgen de la proliferación de queratinocitos basales infectados. Típicamente, la infección se produce cuando las células basales se exponen al virus infeccioso a través de una barrera epitelial alterada como se produciría durante el coito o después de abrasiones cutáneas menores. Las infecciones por VPH no han demostrado ser citolíticas, más bien las partículas víricas se liberan como resultado de la degeneración de células de descamación. Además, el virus del VPH puede sobrevivir durante muchos meses y a bajas temperaturas sin un huésped.

20 La multiplicación del virus, en general, está confinada al núcleo. En consecuencia, las células infectadas presentan normalmente un alto grado de atipia nuclear. La coilocitosis (del griego koilos, que significa vacío) describe una combinación de claro perinuclear (halo) con un núcleo picnótico o encogido (rasinoide) y es un rasgo característico de infección productiva por papilomavirus.

30 El genoma del VPH existe como ADN episómico circular separado del núcleo de la célula huésped en lesiones por VPH benignas o de bajo riesgo, tales como las asociadas típicamente con los tipos 6 y 11 del VPH. Los genomas de los tipos 16 y 18 del VPH de alto riesgo están integrados típicamente en el ADN de la célula huésped en lesiones malignas. La presente invención, sin embargo, se extiende a cualquier cepa del VPH incluyendo pero no limitadas a las cepas 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. La integración del genoma vírico en el genoma de la célula huésped se considera un distintivo de transformación maligna. Se ha demostrado que las proteínas E6 y E7 del VPH de los serotipos de alto riesgo inactivan las proteínas supresoras de tumor del huésped p53 y Rb, teniendo así como resultado una proliferación de células huésped no regulada y transformación maligna.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar, y/o diferenciar entre una o más cepas particulares del VPH en una muestra biológica, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 40 (i) obtener una muestra biológica que comprende supuestamente VPH de un sujeto humano;
- (ii) aislar el ácido nucleico de dicha muestra;
- 45 (iii) amplificar el ácido nucleico de dicha muestra usando cebadores que generan un amplicón que es distinto para cada cepa del VPH;
- (iv) amplificar opcionalmente una secuencia de ácidos nucleicos de control;
- 50 (v) efectuar el marcado del(de los) amplicón(es) enumerados en las etapas (iii) y/o (iv);

(vi) hibridar el(los) amplicón(es) marcado(s) a un conjunto de perlas recubierto con reactantes en los que cada miembro del conjunto de perlas comprende una molécula de ácido nucleico que tiene complementariedad con una secuencia de nucleótidos de una cepa particular del VPH, unida o asociada de otro modo con una perla distinguible fisicoquímicamente; y

5 (vii) determinar a cuál de los reactantes se ha unido un amplicón;

en el que la asociación de un amplicón con un reactante particular es indicativa de la presencia de una cepa particular del VPH en la muestra.

10 La presente invención permite la detección de ADN de VPH amplificado o, con el uso de una transcriptasa inversa, el ARN correspondiente. Por tanto, la presente invención contempla perlas con ARN o ADN o análogos químicos de los mismos.

15 El método de la presente invención se basa, en parte, en detectar y/o diferenciar entre una o más cepas particulares de un analito objeto en una muestra. La referencia en este documento a "cepas particulares de un analito objeto" incluye cualquier variante de las especies o taxón del analito. Los ejemplos de "cepas" de un analito incluyen subespecies del analito, variantes del analito con diferentes niveles de virulencia, variantes del analito que indican pronósticos diferentes cuando se infecta o se coloniza un huésped, variantes bioquímicas del analito y similares.

20 En una realización preferida, el método de la presente invención puede adaptarse para detectar y/o diferenciar entre cepas particulares del VPH que están asociadas con un mayor riesgo o un mayor potencial oncogénico en seres humanos (cepas de alto riesgo) y las que están asociadas con menor riesgo de carcinoma o bajo potencial oncogénico (cepas de bajo riesgo). Por consiguiente, el término cepa del VPH de "alto riesgo" incluye cualquier cepa del VPH que está asociada con el desarrollo de carcinoma, incluido cáncer de cuello uterino, en sujetos humanos. Tal como se indicó anteriormente, las cepas del VPH de alto riesgo ejemplares, que de ningún modo limitan la invención, incluyen VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. Las sondas de captura adecuadas en las perlas para estas cepas del VPH se muestran en la figura 9. El término "sonda" y "cebador" puede usarse de manera intercambiable en este contexto. Las cepas del VPH de "bajo riesgo" incluyen las que no están asociadas o sólo débilmente asociadas con mayor riesgo de carcinoma en sujetos humanos. Típicamente, las cepas del VPH de bajo riesgo son las cepas formadoras de verrugas, incluyendo VPH 6 y VPH 11.

30 Las perlas de la presente invención se acoplan a reactantes que interaccionarán específicamente con un analito de interés dado dentro de una muestra. En un aspecto, los reactantes de la presente invención son ácidos nucleicos y los analitos dentro de la muestra que reaccionan específicamente con el reactante también son ácidos nucleicos.

35 Por tanto, este aspecto de la invención objeto usa cebadores que se dirigen a regiones conservadas de una cepa del VPH pero que flanquean secuencias genómicas específicas de una cepa. Las secuencias específicas de una cepa se denominan secuencias "variables" puesto que varían entre cepas en comparación con las secuencias conservadas que son constantes entre cepas. En el momento de la amplificación, los amplicones se ponen en contacto con subconjuntos de perlas en el conjunto de perlas en el que cada perla de cada subconjunto lleva un cebador o sonda de ácido nucleico de captura capaz de hibridarse a los amplicones específicos de una cepa. La correlación múltiple usando el tamaño de perla, la intensidad de fluorescencia y la especificidad de unión a ADN permite la identificación, clasificación y distinción de cepas del VPH.

40 Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención contempla un conjunto de perlas para detectar una o más cepas del VPH y/o para diferenciar entre dos o más cepas del VPH, en el que el conjunto de perlas comprende una pluralidad de subconjuntos de perlas en los que:

50 (a) las perlas de cada subconjunto son homogéneas con respecto al tamaño;

(b) las perlas dentro de cada subconjunto se acoplan a una sonda de captura de ácido nucleico que es capaz de unirse a una región específica de una cepa del VPH de un genoma del VPH;

55 (c) la sonda de captura en cada perla se marca con la misma marca con cada subconjunto de perlas que tienen una intensidad fluorescente diferente para crear una mezcla heterogénea de perlas basándose en la intensidad fluorescente; y

60 (d) se mezclan entre sí al menos dos subconjuntos de perlas para producir un conjunto de perlas, en el que la identidad del subconjunto y, por lo tanto, la cepa del VPH es identificable por citometría de flujo basándose en el tamaño, la intensidad fluorescente y la discriminación de secuencias.

Otro aspecto de la presente invención contempla un método para detectar y/o diferenciar entre dos o más cepas del VPH en una muestra, que comprende las etapas de:

65 (a) poner en contacto la muestra con un conjunto de perlas que comprende una pluralidad de subconjuntos de perlas

en los que:

(i) las perlas de cada subconjunto son homogéneas con respecto al tamaño,

5 (ii) las perlas dentro de cada subconjunto se acoplan a una sonda de captura de ácido nucleico que es capaz de unirse a una región específica de una cepa del VPH de un genoma del VPH,

10 (iii) la sonda de captura en cada perla se marca con la misma marca con cada subconjunto de perlas teniendo una intensidad fluorescente diferente para crear una mezcla heterogénea de perlas basándose en la intensidad fluorescente, y

15 (iv) se mezclan entre sí al menos dos subconjuntos de perlas para producir un conjunto de perlas, en el que la identidad del subconjunto y, por lo tanto, la cepa del VPH es identificable por citometría de flujo basándose en el tamaño, la intensidad fluorescente y la discriminación de secuencias;

(b) incubar dicho conjunto de perlas con dicha muestra durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir que dichos cebadores se unan al genoma del VPH amplificado para generar un replicón que comprende una región específica de una cepa;

20 (c) detectar y/o diferenciar los amplicones generados en la muestra que se unen a dichas perlas para identificar o distinguir así entre las dos o más cepas del VPH.

Los amplicones para los que las sondas de captura de ácido nucleico son específicos también pueden marcarse con una molécula indicadora fluorescente.

25 Los ácidos nucleicos pueden aislarse a partir de la muestra del sujeto usando cualquier método que sea conveniente con respecto a la naturaleza de la propia muestra y el analito. Tal como se usa en este documento, el término "ácido nucleico" se refiere a ADN y/o ARN. Típicamente, se aísla ADN, aunque bajo algunas circunstancias que resultarían evidentes para un experto en la materia, puede ser más preferible aislar ARN, por ejemplo, cuando el analito de interés es un virus de ARN. Si se aísla ARN, el ARN puede amplificarse, o el ARN puede transcribirse de forma inversa en ADNc usando métodos estándar, para amplificación y análisis posteriores.

30 Con preferencia, el "ácido nucleico" es ADN. Puede aislarse ADN a partir de la muestra usando cualquier medio conveniente. Por ejemplo, en el caso de un virus tal como el VPH en una muestra de células humanas, se puede usar guanidina o un agente funcionalmente equivalente para lisar las células. Un método ejemplar a base de guanidina para la lisis celular y la extracción de ADN es el método de Nelson y Krawetz (Anal. Biochem. 207 (1):97-201, 1992). Las soluciones de lisis a base de guanidina también son comercializadas por proveedores tales como Qiagen, por ejemplo, QIAamp, PAXgene, y similares. Sin embargo, los métodos de lisis pueden cambiar dependiendo de la naturaleza de la muestra y del analito. Por ejemplo, para la detección de un analito en una muestra ambiental tal como una muestra de tierra o de sedimento, puede ser más apropiado un sistema de lisis celular a base de perlas de vidrio, tal como el método de Kuske y col. (Appl. Environ. Microbiol. 64 (7):2463-2472, 1998). En cualquier caso, el protocolo de lisis apropiado para un analito y muestra dados sería determinado fácilmente por alguien con experiencia normal en la materia sin demasiada experimentación.

45 Después de la lisis de las células, el ADN puede purificarse por cualquier medio conveniente, lo que resultaría fácilmente evidente para un experto en la materia (véanse, por ejemplo, los kits disponibles comercialmente anteriores). En una realización preferida de la invención, el ADN se purifica usando una cantidad limitante de un agente de unión de ADN tal como, pero no limitado a, sílice. Usando una cantidad limitante del agente de unión de ADN, puede aislarse una cantidad uniforme de ADN a partir de diferentes muestras ya que la cantidad de ADN recuperado en cada caso es igual a la cantidad máxima de ADN que se puede unir por la cantidad limitante del agente de unión de ADN. El ADN unido al agente de unión de ADN puede entonces recuperarse o eluirse del agente de unión de ADN usando cualquier medio conveniente.

55 Aunque el ADN es un ácido nucleico preferido, también puede aislarse ARN de la muestra usando cualquier protocolo de aislamiento de ARN estándar. El aislamiento de ARN implica típicamente una etapa de ruptura celular y una etapa de aislamiento de ARN. Las técnicas de ruptura celular ejemplares que son adecuadas para el aislamiento de ARN incluyen las presentadas en el documento Ambion Technical Bulletin #183 (www.ambion.com/techlib/tb/tb_183.html). Además, en www.ambion.com/techlib/basics/products/rnaisol_compchart.html se presenta una gama de kits de aislamiento de ARN ejemplares que son adecuados para una gama de tipos de muestra. Sin embargo, debería entenderse que la presente invención no está limitada de ningún modo por estos métodos y kits específicos para aislamiento y purificación de ARN y la presente invención es compatible con cualquier método de aislamiento de ARN que sea evidente para un experto en la materia.

65 El conjunto de perlas puede comprender, en relación con la detección del VPH, tantos subconjuntos de perlas como cepas del VPH. Por tanto, el ensayo puede emplear 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 subconjuntos de

perlas cada uno para las cepas del VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. También pueden usarse perlas adicionales para controles. En la figura 9 se desvelan sondas de captura adecuadas.

5 Por tanto, otro aspecto de la presente invención está dirigido a un conjunto de perlas para detectar una o más cepas del VPH y/o para diferenciar entre dos o más cepas del VPH, en el que el conjunto de perlas comprende una pluralidad de subconjuntos de perlas en los que:

(a) las perlas de cada subconjunto son homogéneas con respecto al tamaño;

10 (b) las perlas dentro de cada subconjunto se acoplan a una sonda de captura de ácido nucleico seleccionada de la lista constituida por los SEQ ID NO: 5 a 20 que es capaz de unirse a una región específica de una cepa del VPH de un genoma del VPH;

15 (c) la sonda de captura en cada perla se marca con la misma marca con cada subconjunto de perlas teniendo una intensidad fluorescente diferente para crear una mezcla heterogénea de perlas basándose en la intensidad fluorescente; y

20 (d) se mezclan entre sí al menos dos subconjuntos de perlas para producir un conjunto de perlas, en los que la identidad del subconjunto y, por lo tanto, la cepa del VPH es identificable por citometría de flujo basándose en el tamaño, la intensidad fluorescente y la discriminación de secuencias.

Otro aspecto adicional de la presente invención contempla un método para detectar y/o diferenciar entre dos o más cepas del VPH en una muestra, que comprende las etapas de:

25 (a) poner en contacto la muestra con un conjunto de perlas que comprende una pluralidad de subconjuntos de perlas en los que:

(i) las perlas de cada subconjunto son homogéneas con respecto al tamaño;

30 (ii) las perlas dentro de cada subconjunto se acoplan a una sonda de captura de ácido nucleico seleccionada de la lista constituida por los SEQ ID NO: 5 a 20 que es capaz de unirse a una región específica de una cepa del VPH de un genoma del VPH;

35 (iii) la sonda de captura en cada perla se marca con la misma marca con cada subconjunto de perlas que tienen una intensidad fluorescente diferente para crear una mezcla heterogénea de perlas basándose en la intensidad fluorescente, y

40 (iv) se mezclan entre sí al menos dos subconjuntos de perlas para producir un conjunto de perlas, en el que la identidad del subconjunto y, por lo tanto, la cepa del VPH es identificable por citometría de flujo basándose en el tamaño, la intensidad fluorescente y la discriminación de secuencias;

45 (b) incubar dicho conjunto de perlas con dicha muestra durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir que dichas sondas se unan al genoma del VPH amplificado para generar un replicón que comprende una región específica de una cepa;

(c) detectar y/o diferenciar los amplicones generados en la muestra que se unen a dichas perlas para identificar o distinguir así entre las dos o más cepas del VPH.

50 Por consiguiente, los conjuntos de perlas pueden comprender en relación al VPH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 subconjuntos de perlas cada uno con una de una molécula de ácido nucleico seleccionada del listado constituido por los SEQ ID NO: 5 a 20. La referencia a estas secuencias específicas de una cepa del VPH en los SEQ ID NO: 5 a 20 incluye moléculas de ácido nucleico que tienen al menos una identidad del 90 % con estas secuencias o capaces de hibridarse a ellas o a sus formas complementarias bajo condiciones de baja rigurosidad. La referencia a al menos el 90 % incluye 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100 %.

55 Los métodos de la presente invención se basan, en parte, en amplificar un ácido nucleico a partir de una muestra usando cebadores que se unen a secuencias conservadas entre diferentes cepas del analito objeto, pero que generan un amplicón que comprende una secuencia de nucleótidos distinta para cada cepa del analito. En efecto, los cebadores usados en la presente invención se unen a secuencias que se conservan entre cepas del analito objeto que flanquean regiones que son al menos parcialmente no conservadas o polimórficas entre cepas. Esquemáticamente, la región amplificada en el analito tiene la estructura general de:

C-X-C'

65 en la que:

C es una secuencia de nucleótidos que se conserva entre dos o más cepas del analito y es el sitio de unión del cebador "directo";

5 X es una secuencia de nucleótidos, parte de la cual o toda comprende una variación entre diferentes cepas del analito;

C es una secuencia de nucleótidos que se conserva entre dos o más cepas del analito y es el sitio de unión del cebador "inverso".

10 La amplificación a partir de los sitios de los cebadores tales como los descritos anteriormente permite eficazmente el uso de un conjunto de cebadores "universales", que se unen en C y C' para amplificar X a partir de una gama de cepas del analito. Además, cabe destacar que el amplicón amplificado usando los cebadores universales puede comprender regiones tanto conservadas como variables.

15 En una realización preferida, se usan cebadores que amplifican secuencias del VPH. Con más preferencia, estos cebadores son GPS+ es 5' TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC 3' (SEQ ID NO:1) y GP6+ es 5' GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC 3' (SEQ ID NO:2). Estos cebadores generan un amplicón a partir del VPH que comprende tanto una región conservada (definida como Y en la figura 3), como una región que es variable entre diferentes cepas del VPH (definida como X en la figura 3).

20 La presente invención también contempla la amplificación de secuencias de control. En una realización, la secuencia de control puede incluir una región del genoma del sujeto del que se deriva una muestra biológica. Sin embargo, la presente invención no está limitada de ningún modo a estas secuencias de control particulares y también se contemplan otras secuencias de control que resultarán evidentes para un experto en la materia. Además, los métodos de la presente invención también pueden realizarse sin la amplificación de una secuencia de control.

En una realización preferida, la secuencia de control se amplifica a partir del genoma de un sujeto humano usando los cebadores LC1_F, que comprende la secuencia de nucleótidos 5' TACACACAGGTGTACACAGA 3' (SEQ ID NO:3) y LC1_R que comprende la secuencia 5' ACCAAGTACTCTACGTGTTG 3' (SEQ ID NO:4).

30 El ADN aislado puede amplificarse usando cualquier protocolo de amplificación de ADN. Una gama de métodos ejemplares para la amplificación de ADN que de ningún modo limitan la invención se presentan en el documento "DNA Amplification: Current Technologies and Applications" (Demidov y Broude Ends., Horizon Bioscience, 2004).

35 El ARN aislado puede amplificarse usando cualquier método de ARN conocido en la técnica y se han desarrollado varias tecnologías de amplificación de ARN. Dos categorías principales de estas son: (i) las que utilizan ciclado térmico tales como RT-PCR y (ii) ensayos isotérmicos tales como la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) (Compton, Nature 350:91-92, 1991; Kievits y col., J. Virol. Methods 35:273-286, 1991) y la amplificación mediada por transcripción (TMA) (Hill, J. Clin. Ligand Assay 19:43-51, 1996). Los ensayos isotérmicos pueden subdividirse, basándose en sí: (i) copian y amplifican la secuencia diana, tal como TMA, NASBA y replicación de secuencia autosostenida (3SR) (Guatelli y col., Proc. Natl Acad. Sci. USA 87:1874-1878, 1990; Chadwick y col., J. Virol. Methods 70:59-70, 1998; para su revisión véase el documento de Chan y Fox, Rev. Med Microbiol. 10:185-196, 1999), o (ii) generan una señal dependiente de la diana que puede amplificarse más, por ejemplo, ensayos invasores (Lyamichev y col., Nat. Biotechnol. 17:292-296, 1999; Ryan y col., Mol. Diagn. 4:135-144, 1999). Existen varias otras tecnologías de amplificación que no encajan fácilmente en estas categorías, tales como la Q beta replicasa (Lizardi y col., Biotechnology 6:1197-1202, 1988) y el ADN ramificado (Todd y col., J. AIDS Hum. Retrovirol. 10:S35-544, 1995; Pawlotsky y col., J. Virol. Methods 79:227-235, 1999). Sin embargo, debería entenderse que la presente invención contempla cualquier método de amplificación de ARN que resultaría evidente para un experto en la materia. Además, debería entenderse que la presente invención también contempla el uso de transcriptasa inversa o un equivalente funcional de la misma para convertir ARN en ADN que luego pueda amplificarse posteriormente.

De acuerdo con la presente invención, se marcan los amplicones enumerados en las etapas (iii) y/o (iv) de los métodos descritos anteriormente. Los amplicones de la presente invención pueden marcarse usando cualquier medio conveniente. Los métodos ejemplares incluyen métodos tanto pre- como post-síntesis. Los métodos de marcado presíntesis incluyen el marcado de un cebador de PCR que se usa posteriormente para amplificación de, y se incorpora de este modo en, un amplicón por medio de PCR. En este método, la marca se une típicamente al extremo 5' de un cebador adecuado para la amplificación del amplicón, aunque también se contempla el marcado en otras posiciones dentro del cebador, tal como el marcado en 3' o el marcado no terminal.

60 También se puede usar un enlazador químico entre la marca y el polinucleótido que se marca. Las secuencias de enlazadores apropiados se determinarán fácilmente por los expertos en la materia, y es probable que incluyan enlazadores tales como modificadores amino C6, C7 y C12 y enlazadores que comprenden grupos tiol. Como se determinará fácilmente, un cebador puede comprender el enlazador y la marca, o el enlazador solo, al que se puede unir la marca en una fase posterior.

65

Los métodos de marcado post-amplificación incluyen sistemas de marcado por mella en los que un polinucleótido marcado se sintetiza a partir del amplicón usando polimerasa Klenow, o un equivalente funcional de la misma, a partir de cebadores aleatorios. Los nucleótidos marcados, o los nucleótidos que comprenden un grupo enlazador, pueden incorporarse en el polinucleótido sintetizado con polimerasa Klenow durante la síntesis.

5 En cualquier caso, otros métodos de marcado resultarán fácilmente evidentes para un experto en la materia y debería entenderse que la presente invención no está definida o limitada de ningún modo por la elección del método de marcado.

10 Con preferencia, la marca usada es un "marcador fluorescente" o "fluoróforo". Muchos marcadores fluorescentes diferentes resultarán familiares para los expertos en la materia, y la elección del marcador fluorescente no limita de ningún modo la invención. En una realización preferida de la presente invención, los marcadores fluorescentes de la presente invención comprenden cualquier marcador fluorescente que pueda unirse a un polinucleótido y que se pueda excitar usando una fuente de luz seleccionada del siguiente grupo:

15 (i) Láseres de iones de argón: comprenden una línea azul de 488 nm, que es adecuada para la excitación de muchos colorantes y fluorocromos que presentan fluorescencia en la región de verde a roja. También se dispone de láseres de argón sintonizables que emiten en un intervalo de longitudes de onda (458 nm, 488 nm, 496 nm, 515 nm y otras).

20 (ii) Láseres de diodo: tienen una longitud de onda de emisión de 635 nm. Otros láseres de diodo de los que se dispone ahora funcionan a 532 nm. De manera interesante, esta longitud de onda excita óptimamente el yoduro de propidio (PI). La tinción PI se usa ampliamente para el análisis de ADN, el recuento de vivos/muertos y la determinación de ploidía. También se dispone de láseres de diodo azul que emiten luz aproximadamente a 476 nm.

25 (iii) Láseres de gas HeNe: funcionan con la línea roja de 633 nm.

(iv) Láseres de HeCd: funcionan a 325 nm.

30 (v) Lámpara de arco de mercurio de 100 W: la fuente de luz más eficaz para la excitación de colorantes UV como Hoechst y DAPI.

En realizaciones más preferidas de la presente invención, los marcadores fluorescentes se seleccionan de: hidroxycumarina, aminocumarina, metoxicumarina, azul cascada, amarillo Lucifer, NBD, ficoeritrina (PE), PerCP, 35 alofocianina, Hoechst 33342, DAP1, azul SYTOX, Hoechst 33258, cromomicina A3, mitramicina, YOYO-1, verde SYTOX, naranja SYTOX, 7-AAD, naranja de acridina, TOTO-1, To-PRO-1, naranja de tiazol, TOTO-3, TO-PRO-3, LDS 751, colorantes Alexa Fluor incluyendo Alexa Fluoro-350, -430, -488, -532, -546, -555, -556, -594, -633, -647, -660, -680, -700 y -750; colorantes BoDipy, incluyendo BoDipy 630/650 y BoDipy 650/665; colorantes CY, en particular Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy 5.5 y Cy7; 6-FAM (fluoresceína); PE-Cy5, PE-Cy7, fluoresceína dT; 40 hexaclorofluoresceína (Hex); 6-carboxi-4', 5'-dicloro-2', 7'-dimetoxifluoresceína (JOE); colorantes Oregon Green, incluyendo 488-X y 514; colorantes de rodamina, incluyendo X-rodamina, lisamina rodamina B, verde de rodamina, rojo de rodamina y ROX; TRITC, tetrametilrodamina (TMR); carboxitetrametilrodamina (TAMRA); tetraclorofluoresceína (TET); Rojo 6B, FluorX, BODIPY-FL, colorante SYBR Green I, y Texas Red. En realizaciones particularmente preferidas de la presente invención, el marcador es Cy5, el cual es particularmente conveniente para la práctica de la presente invención.

50 Sin embargo, en realizaciones alternativas de la invención, pueden usarse marcas radioactivas o no radioactivas para marcar el amplicón. Las marcas radioactivas convenientes incluyen ³²P y ³H. Estas marcas pueden incorporarse en el amplicón y/o cebador usando cualquier medio conveniente. También puede usarse una gama de métodos de marcado no radioactivos. Los métodos de marcado no radioactivos ejemplares que no limitan de ningún modo la presente invención se presentan en el documento de Speel (Histochem. Cell Biol. 112:89-113, 1999).

55 Tal como se usa en este documento, debería entenderse que el término "reactante" comprende un polinucleótido inmovilizado en una perla. Más en particular, cada reactante comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que es complementaria a un amplicón generado según los métodos descritos en este documento, que se une o asocia de otro modo con una perla distinguible fisicoquímicamente. Un reactante también puede comprender una secuencia que sea complementaria a una secuencia de control tal como se definió anteriormente en este documento, es decir, una secuencia amplificada a partir del genoma de un organismo multicelular (Z) o el amplicón de una secuencia de nucleótidos que se conserva entre cepas del analito (Y).

60 Por consiguiente, un conjunto de perlas de reactantes puede comprender:

[B₁-cX₁, B₂-cX₂, B₃-cX₃...B_n-cX_n, B_y-cY, B_z-cZ]

65 en el que:

B₁...B_n, B_y, B_z son cada uno perlas que se puede distinguir fisicoquímicamente;

cX_n es un polinucleótido inmovilizado en una perla en el que dicho polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de ácidos nucleicos particular que es específica de un analito o una cepa particular de un analito objeto y en el que n es el número de analitos o cepas particulares de un analito objeto que han de detectarse usando el conjunto de perlas;

cY es un miembro opcional del conjunto de perlas y es un polinucleótido inmovilizado en una perla en el que dicho polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia que se conserva entre los analitos o cepas de un analito objeto;

cZ es un miembro opcional del conjunto de perlas y es un polinucleótido inmovilizado en una perla en el que dicho polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de control que se amplifica a partir de un sujeto multicelular.

Preferentemente, el analito objeto es el VPH y la secuencia de ADN de control es una secuencia de ADN genómico humano.

Por "complementaria", ha de entenderse que el polinucleótido inmovilizado del reactante debería hibridarse a un amplicón generado según los métodos descritos en este documento bajo condiciones de baja rigurosidad. Con preferencia, el polinucleótido inmovilizado debería unirse a la muestra y estándar bajo condiciones de rigurosidad media y, con más preferencia, el polinucleótido inmovilizado debería unirse a la muestra y estándar bajo condiciones de alta rigurosidad.

La referencia en este documento a baja rigurosidad incluye y engloba formamida desde al menos aproximadamente el 0 hasta al menos aproximadamente el 15 % v/v (incluyendo formamida al 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 % y 14 % v/v) y sal desde al menos aproximadamente 1 M hasta al menos aproximadamente 2 M para hibridación, y sal de al menos aproximadamente 1 M hasta al menos aproximadamente 2 M para condiciones de lavado. En general, la baja rigurosidad es desde aproximadamente 25-30 °C hasta aproximadamente 52 °C, tal como 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 y 52 °C. Puede alterarse la temperatura y usarse temperaturas más altas para reemplazar la formamida y/o para ofrecer condiciones de rigurosidad alternativas. Pueden aplicarse condiciones de rigurosidad alternativas cuando sea necesario, tales como rigurosidad media, la cual incluye y engloba formamida desde al menos aproximadamente el 16 % v/v hasta al menos aproximadamente el 30 % v/v, incluyendo formamida al 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 24 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 % y 30 % v/v, y sal desde al menos aproximadamente 0,5 M hasta al menos aproximadamente 0,9 M para hibridación, y sal de al menos aproximadamente 0,5 M hasta al menos aproximadamente 0,9 M para condiciones de lavado, o rigurosidad alta, que incluye y engloba formamida desde al menos aproximadamente el 31 % v/v hasta al menos aproximadamente el 50 % v/v y sal desde al menos aproximadamente 0,01 M hasta al menos aproximadamente 0,15 M para hibridación, y sal de al menos aproximadamente 0,01 M hasta al menos aproximadamente 0,15 M para condiciones de lavado. En general, el lavado se lleva a cabo a $T_m = 69,3 + 0,41 (G+C)\%$ (Marmur y Doty, J. Mol. Biol. 5:109, 1962). Sin embargo, la T_m de un ADN dúplex disminuye en 1 °C con cada incremento del 1% en el número de pares de bases desapareadas (Bonner y Laskey, Eur. J. Biochem. 46:83, 1974). La formamida es opcional en estas condiciones de hibridación. Por consiguiente, los niveles particularmente preferidos de rigurosidad se definen como sigue: baja rigurosidad es 6 x tampón SSC, SDS al 0,1 % p/v a 25-42 °C; una rigurosidad moderada es 2 x tampón SSC, SDS al 0,1 % p/v a una temperatura comprendida entre 20 °C y 65 °C; alta rigurosidad es 0,1 x tampón SSC, SDS al 0,1 % p/v a una temperatura de al menos 65 °C.

Las perlas, B₁...B_n, B_y, B_z, de los conjuntos de perlas de reactante son cada una perlas distinguibles fisicoquímicamente. El término "distinguible fisicoquímicamente" se refiere a cualquier característica física o química que permite que una perla, por ejemplo B₁, se diferencie de otra perla, por ejemplo B₂. Por consiguiente, las perlas distinguibles fisicoquímicamente permiten la diferenciación de reactantes particulares.

En una realización preferida la perla comprende una "micropartícula". Como resultará evidente para los expertos en la materia, puede usarse casi cualquier material, homogéneo o de otro tipo, para la micropartícula. Las micropartículas contempladas en este documento también pueden comprender más de una sustancia, y como tales pueden comprender envolturas, aleaciones o mezclas de sustancias orgánicas y/o inorgánicas. Los materiales particularmente útiles que pueden usarse de acuerdo con la presente invención y que representan realizaciones preferidas de la presente invención incluyen materiales seleccionados de la lista constituida por: sílice (por ejemplo: cuarzo o vidrio), látex, titania, dióxido de estaño, itria, alúmina, y otros óxidos de metales binarios (tales como ZnO), perovskitas y otros óxidos de metales piezoeléctricos (tales como BaTiO₃), ZnS, sacarosa, agarosa y otras perlas poliméricas. En una realización particularmente preferida, la micropartícula comprende sílice.

En una realización preferida, el término "distinguible fisicoquímicamente" se refiere a una diferencia mensurable en cualquiera de tamaño de perla, la presencia o ausencia de una marca ópticamente detectable particular y/o la intensidad de una marca ópticamente detectable.

La perla contemplada por la presente invención puede producirse en cualquier forma tridimensional regular o irregular conveniente. Sin embargo, generalmente es práctico sintetizar esferas pequeñas o partículas esféricas. Tales esferas o partículas esféricas también se denominan en este documento "perlas". Por consiguiente, en realizaciones preferidas de la presente invención, las "micropartículas" de la presente invención son sustancialmente esféricas o esféricas o comprenden una "microesfera".

Aunque las perlas de la presente invención pueden denominarse "microesferas" el tamaño real de las partículas depende de una diversidad de factores y las partículas realmente pueden comprender o no medidas en el intervalo de micrómetros. En una realización preferida la perla comprende un diámetro (o medida equivalente en una partícula no esférica) de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 30 μm , incluyendo 300 nm, 350 nm, 400 nm, 450 nm, 500 nm, 550 nm, 600 nm, 650 nm, 700 nm, 750 nm, 800 nm, 850 nm, 900 nm, 950 nm, 1,0 μm , 1,1 μm , 1,2 μm , 1,3 μm , 1,4 μm , 1,5 μm , 1,6 μm , 1,7 μm , 1,8 μm , 1,9 μm , 2,0 μm , 2,1 μm , 2,2 μm , 2,3 μm , 2,4 μm , 2,5 μm , 2,6 μm , 2,7 μm , 2,8 μm , 2,9 μm , 3,0 μm , 3,1 μm , 3,2 μm , 3,3 μm , 3,4 μm , 3,5 μm , 3,6 μm , 3,7 μm , 3,8 μm , 3,9 μm , 4,0 μm , 4,1 μm , 4,2 μm , 4,3 μm , 4,4 μm , 4,5 μm , 4,6 μm , 4,7 μm , 4,8 μm , 4,9 μm , 5,0 μm , 5,1 μm , 5,2 μm , 5,3 μm , 5,4 μm , 5,5 μm , 5,6 μm , 5,7 μm , 5,8 μm , 5,9 μm , 6,0 μm , 6,1 μm , 6,2 μm , 6,3 μm , 6,4 μm , 6,5 μm , 6,6 μm , 6,7 μm , 6,8 μm , 6,9 μm , 7,0 μm , 7,1 μm , 7,2 μm , 7,3 μm , 7,4 μm , 7,5 μm , 7,6 μm , 7,7 μm , 7,8 μm , 7,9 μm , 8,0 μm , 8,1 μm , 8,2 μm , 8,3 μm , 8,4 μm , 8,5 μm , 8,6 μm , 8,7 μm , 8,8 μm , 8,9 μm , 9,0 μm , 9,1 μm , 9,2 μm , 9,3 μm , 9,4 μm , 9,5 μm , 9,6 μm , 9,7 μm , 9,8 μm , 9,9 μm , 10 μm , 11 μm , 12 μm , 13 μm , 14 μm , 15 μm , 16 μm , 17 μm , 18 μm , 19 μm , 20 μm , 21 μm , 22 μm , 23 μm , 24 μm , 25 μm , 26 μm , 27 μm , 28 μm , 29 μm , 30 μm . Con más preferencia, la perla comprende un diámetro (o medida equivalente en una partícula no esférica) de entre 1 μm y 10 μm .

En una realización particularmente preferida, las perlas son perlas AmpaSand (marca registrada: Genera Biosystems) producidas por Genera Biosystems. Estas perlas se comercializan y se describen en www.generabiosystems.com/generabiosystems/technology/AmaSandBeads/. Sin embargo, la presente invención no debería considerarse de ningún modo limitada al uso de estas perlas específicamente.

Las perlas pueden distinguirse basándose en la presencia o ausencia de una o más "marcas ópticamente detectables". Típicamente, una perla particular puede comprender 0, 1, 2, 3, 4, 5 marcas ópticamente detectables. Tal como se usa en este documento, el término "marca ópticamente detectable" se refiere a cualquier molécula, átomo o ion que emite fluorescencia, fosforescencia y/o incandescencia. Las marcas ópticamente detectables convenientes incluyen las que emiten en los intervalos ultravioleta (intervalo de longitud de onda de aproximadamente 350 nm a aproximadamente 800 nm), visible (intervalo de longitud de onda de aproximadamente 350 nm a aproximadamente 800 nm), infrarrojo cercano (NIR) (intervalo de longitud de onda de aproximadamente 800 nm a aproximadamente 1500 nm) y/o infrarrojo (IR) (intervalo de longitud de onda de aproximadamente 1500 nm a aproximadamente 10 μm). Sin embargo, debido a la facilidad de detección, en una realización particularmente preferida, la marca ópticamente detectable es detectable en el intervalo de longitud de onda visible.

En realizaciones preferidas adicionales de la invención objeto, la marca ópticamente detectable comprende una o más marcas seleccionadas de la lista constituida por: un fluoróforo, una partícula semiconductor, una partícula de fósforo, una partícula dopada, o un nanocrystal o punto cuántico.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, la marca ópticamente detectable es un fluoróforo. Tal como se usa en este documento, el término "fluoróforo" se refiere a cualquier molécula que presente la propiedad de fluorescencia. Para los fines del presente documento, el término "fluorescencia" puede definirse como la propiedad de una molécula de absorber luz de una longitud de onda particular y reemitir luz de una longitud de onda más larga. El cambio de longitud de onda se refiere a una pérdida de energía que tiene lugar en el proceso. El término "fluoróforo" puede englobar una gama de marcas ópticamente detectables tales como fluoróforos químicos y colorantes así como puntos cuánticos.

Una marca ópticamente detectable particularmente conveniente que puede usarse de acuerdo con la presente invención es incrustar partículas fluorescentes de semiconductores. Estas partículas de marcas ópticamente detectables pueden ser tan pequeñas que sus propiedades y emisión se vuelven dependientes del tamaño. Tales pequeñas partículas de marcas ópticamente detectables se denominan en la técnica nanopartículas semiconductoras, puntos cuánticos, cables cuánticos, varillas cuánticas o nanocrystalos o partículas Q. Sin embargo, tal como se usa en este documento, debe entenderse que el término "punto cuántico" o "QD" engloba todas estas partículas. Además, las marcas ópticamente detectables que comprenden QD pueden comprender partículas aproximadamente esféricas o esféricas, o partículas esféricas o esféricas recubiertas. Sin embargo, no debería considerarse de ningún modo que el término QD se limita a una morfología esférica, esférica, circular, cilíndrica o cualquier otra morfología de un "punto". Por ejemplo, tal como se usa en este documento, los QD también pueden comprender otras morfologías incluyendo, entre otras, partículas similares a varillas, elipsoidales, o similares a varillas o elipsoidales recubiertas.

Los QD consisten en un núcleo cristalino a escala nanométrica de material semiconductor; las versiones biológicamente activas están rodeadas típicamente por una envoltura protectora y un recubrimiento externo. Por

ejemplo, los QD pueden comprender cristallitos semiconductores que son de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 30 nm de diámetro y pueden contener aproximadamente 50-500.000 átomos dentro del cristal, incluyendo cristales luminiscentes que comprenden materiales tales como ZnS, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe, PbS, PbSe, PbTe, HgS, HgSe, HgTe, Si, ZnO.

5 Los QD presentan fluorescencia con un espectro de absorción amplio y un espectro de emisión estrecho. A diferencia de algunos otros fluoróforos, que tienen distintos espectros de absorción, los QD absorben la luz en un intervalo espectral ancho, lo que permite que los puntos cuánticos sean excitados con una gama de fuentes de luz, tales como láseres, lámparas de arco o LED. Además, puede usarse una colección de diferentes QD en múltiples aplicaciones usando sólo una única fuente de excitación. Sin embargo, los espectros de emisión para cada punto son típicamente muy estrechos, del orden de aproximadamente 30 nm, dependiendo el color exacto del diámetro y la composición de la partícula. Además, el espectro de emisión estrecho de los QD permite la resolución espectral de puntos adyacentes. Además de los beneficios anteriores, los QD también son relativamente fotoestables, incluso durante excitación intensa, y son más brillantes que los fluoróforos.

15 En vista de lo anterior, también debería entenderse que la presente invención engloba el uso de QD de diferente tamaño.

20 Además, la presente invención contempla QD que se tratan con procedimientos tales como tratamiento térmico, modificación superficial, aleación, pasivación superficial o tapado con recubrimientos superficiales para permitir que el QD emita con rendimiento cuántico alto y para mejorar la fotoestabilidad durante largos periodos de tiempo.

25 Los QD también son comercializados por compañías tales como Quantum Dot Corp. (QDC), que produce QD tales como el conjugado de estreptavidina Qdot [Marca registrada] 605, que contiene un núcleo de seleniuro de cadmio que emite a 605 nm. También se dispone de conjugados de Qdot que emiten a 525, 565, 585 y 655 nm. Sin embargo, debería entenderse que la presente invención no está limitada de ningún modo por la composición particular del QD (o cualquier otra marca ópticamente detectable) y cualquier QD (comercial o de otro tipo) puede ser compatible con la presente invención.

30 También existen muchos colorantes fluorescentes que están disponibles en la técnica que pueden usarse como fluoróforos de acuerdo con la presente invención. Una propiedad importante de un colorante fluorescente u otro fluoróforo, que determina su potencial para su uso es la longitud de onda de excitación del fluoróforo; debe coincidir con las longitudes de onda disponibles de la fuente de luz. Sin embargo, muchos colorantes fluorescentes diferentes y otros fluoróforos serán familiares para los expertos en la materia, y la elección del marcador fluorescente no limita de ningún modo la invención objeto. Colorantes fluorescentes particularmente convenientes que pueden usarse para el mercado de un sustrato incluyen los analizados anteriormente con respecto al marcado del amplicón de PCR. Sin embargo, cuando se eligen marcas fluorescentes, los espectros de emisión de la marca fluorescente usada para el(los) agente (s) aglomerantes deberían ser distintos del espectro de emisión de la marca usada para el(los) amplicón(es).

40 Comúnmente se usan dos técnicas de tñido para marcar de manera fluorescente perlas y microesferas: tñido interno y tñido externo (marcado superficial). Las dos técnicas producen perlas con propiedades únicas, cada una beneficiosa para diferentes aplicaciones. El tñido interno produce partículas extremadamente estables con emisiones de fluorescencia típicamente estrechas. A menudo, estas perlas presentan una mayor resistencia a la fotodecoloración. Puesto que el fluoróforo está dentro de las perlas, se dispone de grupos superficiales para su uso en la conjugación de ligandos (proteínas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc.) a la superficie de la perla. Por esta razón, las perlas marcadas internamente se usan típicamente en detección de analitos y aplicaciones de inmunoensayo. El marcado superficial implica la conjugación del fluoróforo a la superficie de la perla. Debido a que los fluoróforos están sobre la superficie de la perla, pueden interaccionar con su entorno simplemente como los fluoróforos sobre la célula tñida. El resultado es una perla estándar que presenta las mismas propiedades de excitación y emisión que las muestras de células tñidas, bajo una diversidad de condiciones diferentes, tales como la presencia de contaminantes o cambios en el pH. La naturaleza "ambientalmente receptiva" de las perlas marcadas en superficie las hace idealmente adecuadas para imitar muestras biológicas. Las perlas marcadas externamente se usan con frecuencia como controles y estándares en varias aplicaciones que utilizan detección por fluorescencia. Sin embargo, la presente invención contempla la asociación de una perla con una marca fluorescente por cualquier medio.

60 Los términos "perlas fosforescentes", "perlas de fósforo" y "fósforos" se usan de forma intercambiable en este documento. Lo que constituye una marca ópticamente detectable fosforescente sería entendido fácilmente por un experto en la materia. Sin embargo, a modo de ejemplo, lo que no limita de ningún modo la invención, los fósforos adecuados incluyen partículas pequeñas de ZnS, ZnS:Cu, óxido de Eu y otros fósforos usados en dispositivos de presentación.

65 Una marca ópticamente detectable que comprende una "perla dopada" puede incluir una partícula que comprende cantidades ocultas de uno o más iones de tierras raras, tales como Eu, Y, Yb, Sm y similares.

Tal como se usa en este documento, debería entenderse que el término "marca ópticamente detectable" también engloba múltiples marcas ópticamente detectables, mezclas de marcas ópticamente detectables, nanocristales recubiertos, aleaciones y otras mezclas complejas que resultarán evidentes para el experto en la materia. Se debe considerar que el uso de todas estas marcas ópticamente detectables está dentro del alcance de los métodos y agentes descritos en este documento.

Además, la marca ópticamente detectable del reactante puede comprender una marca ópticamente detectable incorporada en la secuencia de polinucleótidos inmovilizada que está unida o asociada de otro modo con la perla, en lugar de que una perla esté asociada directamente con la perla en sí.

Las perlas están marcadas generalmente por el oligonucleótido de "etiqueta" o sonda inmovilizado. Esta etiqueta lleva una amina interna (NH₂) que después se modifica por conjugación con un éster de succinimidilo de un colorante. En el conjunto actual, el colorante usado es BODIPY-TMR. Mezclando etiquetas marcadas y no marcadas y después conjugando esta mezcla con las perlas, se pueden producir clases de perlas con diferentes niveles del marcador fluorescente. Las proporciones usadas convenientemente están en una serie de 1:5^x; es decir, las diferentes clases se producen usando la proporción de etiquetas no marcadas: marcadas. Esto se ejemplifica genéricamente a continuación en la tabla 4.

Tabla 4 - Proporción de etiquetas no marcadas:marcadas

Clase	Cantidad rel. de no marcadas	Cant. rel de marcadas
Todas	0	Todas
Ninguna	Todas	0
1/5	5	1
1/25	25	1
1/125	125	1

La marca ópticamente detectable puede aplicarse a una perla en un intervalo de concentraciones o intensidades, proporcionando por ello otra base sobre la cual las perlas particulares pueden ser "distinguibles fisicoquímicamente". Por ejemplo, si se considera que la intensidad detectable máxima de la señal de una marca ópticamente detectable particular es el 100 %, la marca puede aplicarse a una gama de perlas para dar intensidades del 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %.

En una realización particularmente preferida, el conjunto de perlas de reactantes comprende perlas de 3,0 µm, 3,5 µm, 4,1 µm, 5,0 µm, 5,6 µm y 6,8 µm, en el que las perlas 3,0 µm, 3,5 µm y 4,1 µm de diámetro están marcadas al 0 % y 100 %, las perlas de 5,0 µm de diámetro están marcadas al 0 %, 100 % y 20 % y las perlas de 5,6 µm y 6,8 µm de diámetro están marcadas al 0 %, 100 %, 20 % y 4 %.

El componente de polinucleótido inmovilizado del reactante, por ejemplo, cXn, cY y/o cZ puede unirse a una perla usando cualquier medio conveniente.

El polinucleótido inmovilizado puede encapsularse en perlas durante su producción o puede unirse a su superficie post-producción. El método de elección usado para asociar el polinucleótido con la perla dependerá del material usado, como determinaría fácilmente el experto en la materia. Además, pueden realizarse tratamientos adicionales, incluida la silanización (recubrimiento del sustrato con silanos), en las perlas antes de la unión del polinucleótido con el fin de incrementar la unión de dicho polinucleótido a la perla.

Generalmente, las perlas pueden recubrirse con cualquier compuesto que se una covalentemente, o se adsorba de otro modo, a la superficie de la perla, y además el reactante también debería tener una fracción química para la unión de un polinucleótido, tal como un grupo tiol, amina o carboxilo. Ejemplos de compuestos con estas características incluyen silanos terminados en amino tales como amino-propiltrimetoxisilano y aminopropiltriethoxisilano. Además de los silanos, los compuestos tales como poli-L-lisina que se unen covalentemente a la superficie de vidrio y adsorben electrostáticamente los grupos fosfato del polinucleótido también están dentro del alcance de la presente invención. Por lo tanto, otros compuestos, incluyendo otros silanos adecuados para la unión de un polinucleótido a una superficie serían identificados fácilmente por el experto en la materia, y la presente invención no está limitada por la elección del compuesto.

El polinucleótido puede unirse a la perla usando cualquier medio conveniente; esto se hace típicamente por adsorción física o enlace químico. Además, las perlas pueden cubrirse adicionalmente con un agente que promueva o incremente la adsorción o la unión del polinucleótido a la superficie de la perla, tal como amino-silanos. Sin embargo, otros agentes que realizan esta función serán identificados fácilmente por expertos en la materia.

En una realización, la molécula de ácido nucleico se une a la perla por medio del Universal Anchoring System (UAS)

(marca registrada: Genera Biosystems). En resumen, este sistema implica el uso de una molécula de ácido nucleico "puente" para ligar una secuencia de "etiqueta" de ácido nucleico sobre el sustrato con una secuencia diana. La secuencia "puente" es parcialmente complementaria a la secuencia de etiqueta y parcialmente complementaria a la secuencia diana, de manera que la secuencia puente puede unirse a las secuencias tanto de etiqueta como diana y sujetarlas alineadas de manera que las secuencias de etiqueta y diana puedan ligarse usando una ligasa. El UAS también se comercializa y se describe en detalle en www.generabiosystems.com/generabiosystems/technology/UAS/. Sin embargo, no debería considerarse que la presente invención esté limitada de ningún modo a este método particular de ligar una molécula de ácido nucleico a un sustrato.

La determinación de si se ha producido la unión entre un amplicón y un reactante puede hacerse usando cualquier metodología que permita la localización de una marca de amplicón unida a un reactante distinguible fisicoquímicamente particular. En una realización particularmente preferida, se usa citometría de flujo.

La citometría de flujo puede definirse como una tecnología para medir propiedades de partículas o células a medida que se mueven, o fluyen, en suspensión líquida. Puede hacerse una analogía con un artículo más familiar de equipo de laboratorio, el microscopio, para describir adicionalmente esta tecnología. La mayoría de los microscopios tienen los siguientes componentes:

Una fuente de luz

El microscopio típico usa una bombilla para iluminar el objeto. En el citómetro de flujo, la fuente de luz a menudo es un láser. Se usan láseres porque proporcionan un haz muy concentrado e intenso de luz monocromática. El carácter monocromático de la luz es especialmente importante en la realización de medidas de fluorescencia.

La platina

En un microscopio, la platina es movable para permitir el paso del objeto al campo de visión de un objetivo. En el citómetro de flujo, las células o partículas existen en suspensión líquida. El líquido fluye en respuesta a la presión del aire, pasa por un objetivo, llevando así las células o partículas a través del campo de visión.

La lente

Tanto en el microscopio como en el citómetro de flujo, la lente recoge la luz procedente del objeto.

Los filtros

Algunos microscopios tienen filtros para seleccionar aquellas características de la luz que son las más importantes para el observador. Esto es particularmente cierto en los microscopios de fluorescencia. En la fluorescencia, las moléculas de colorante son excitadas por luz de una longitud de onda característica, que luego producen luz emitida de una longitud de onda más larga. Los filtros eliminan la luz de excitación para permitir que la luz de emisión se observe o se mida.

Los detectores

En un microscopio, el detector de luz es el observador. El citómetro de flujo usa detectores de luz altamente sensibles denominados tubos fotomultiplicadores (PMT). Los detectores deben poder medir los breves destellos de luz emitida procedentes de las células o partículas que se mueven de una en una en cada tiempo a través del campo de visión del objetivo a velocidades de hasta varios miles por segundo.

La mayoría de los citómetros de flujo pueden medir tanto dispersión de luz como fluorescencia.

La figura 1 muestra los componentes principales de un modelo particular de citómetro de flujo. Un depósito en el fondo suministra un tampón que lleva las células o partículas a través del instrumento, mientras que un segundo depósito recoge todo el fluido sobrante. El propósito del fluido portador (denominado normalmente fluido envolvente) es extraer la suspensión de manera que las células o partículas pasen en una sola fila a través del haz láser.

El láser en la parte delantera izquierda ilumina las células o partículas que fluyen hacia arriba desde el tubo de ensayo con un haz azul. La dispersión de luz directa es recogida por una lente alineada con el haz láser (el propio haz láser es bloqueado por una pequeña barra opaca) y reflejada sobre un detector de luz. La dispersión de luz lateral y la fluorescencia es recogida por una lente situada en un ángulo recto respecto al haz láser. El instrumento ilustrado puede medir tres colores de fluorescencia en las regiones verde, naranja y roja del espectro. Los colores son separados por filtros que reflejan o transmiten sólo las longitudes de onda deseadas hacia los detectores apropiados.

Por último, todas las señales electrónicas procedentes de los detectores se hacen pasar por un ordenador (no

mostrado) que las registra y muestra los resultados. Como todas las medidas se hacen sobre cada célula simultáneamente, pueden determinarse las correlaciones entre ellas. Además, una medida puede usarse para seleccionar un subconjunto de células para estudio usando otra medida. Por ejemplo, es posible examinar tanto la fluorescencia como el tamaño de partícula.

5 En una realización preferida, las perlas se detectan y/o se clasifican según el método de la presente invención usando citometría de flujo. La presente invención, sin embargo, no se limita de ningún modo al método o aparato de citometría de flujo particular descrito anteriormente en este documento. Este ejemplo se proporcionó sólo con fines ilustrativos, y la presente invención no se limitará a un instrumento o método según el ejemplo proporcionado.

10 Usando citometría de flujo, el tamaño de una perla dada puede determinarse por la dispersión de luz del objeto.

15 La dispersión de luz es la interacción de luz y materia. Todos los materiales, incluyendo las perlas, dispersarán luz. Se compone en gran parte de luz que se refleja o se refracta. La posición desde la que se ve un objeto a menudo determina lo que puede decirse sobre él. En el citómetro de flujo, los detectores de dispersión de luz normalmente están situados opuestos al láser (en relación con la célula o partícula), y a un lado del láser, alineados con la intersección del flujo de fluido/haz láser. Las medidas realizadas por estos detectores se denominan dispersión de luz directa y dispersión de luz lateral, respectivamente.

20 La dispersión de luz directa proporciona alguna información sobre el tamaño relativo de las células o partículas individuales, mientras que la dispersión de luz lateral proporciona alguna información sobre la granularidad relativa de las perlas individuales. A menudo se usan en combinación para distinguir las diferentes categorías principales de leucocitos en sangre de mamífero no separada, pero también son útiles en una amplia variedad de otros ensayos, tales como la determinación del tamaño de una micropartícula.

25 Los presentes inventores han determinado que la citometría de flujo puede distinguir entre perlas de aproximadamente 3,0 μm , aproximadamente 3,5 μm , aproximadamente 4,1 μm , aproximadamente 5,0 μm , aproximadamente 5,6 μm y aproximadamente 6,8 μm de diámetro. También pueden distinguirse otras clases de perlas, tales como de entre 5,0 y 5,6 y 5,6 y 6,8. Por consiguiente, los presentes inventores han identificado que la citometría de flujo puede diferenciar al menos hasta 6 tamaños de perlas diferentes.

30 Además de la detección por tamaño, los citómetros de flujo tienen típicamente uno o más láseres y detectores para la detección de fluorescencia en una muestra. La fluorescencia es la propiedad de una molécula de absorber luz de una longitud de onda particular y reemitir luz de una longitud de onda más larga. El cambio de longitud de onda se refiere a una pérdida de energía que tiene lugar en el proceso. Es una característica que hace que la fluorescencia sea extremadamente útil: pueden usarse filtros para excluir la luz de excitación del detector de luz o del observador. Por tanto, la única luz medida u observada proviene del fluoróforo. La interferencia del fondo o la luz parásita que choca con los detectores es extremadamente baja.

40 Existen muchos colorantes fluorescentes que son útiles para la citometría de flujo. Se unen a una diversidad de componentes citoquímicos, tales como ácidos nucleicos; proteínas; receptores de membranas celulares, nucleares y citoplásmicos específicos; moléculas iónicas intracelulares; y muchos más. Una propiedad clave de un colorante fluorescente que determina su potencial para su uso en un ensayo citométrico de flujo es la longitud de onda de excitación, es decir, debe coincidir con las longitudes de onda disponibles de la fuente de luz.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para diagnosticar una infección por un analito patógeno en un sujeto, comprendiendo dicho método:

- 50 (i) obtener una muestra biológica del sujeto que comprende supuestamente dicho analito patógeno;
- (ii) aislar el ácido nucleico de dicha muestra;
- (iii) amplificar el ácido nucleico de dicha muestra usando cebadores que generan un amplicón que es distinto para dicho analito o una cepa particular de dicho analito;
- 55 (iv) amplificar opcionalmente una secuencia de ácido nucleico de control del sujeto;
- (v) efectuar opcionalmente el marcado del(los) amplicón(es) enumerado(s) en las etapas (iii) y/o (iv) ;
- 60 (vi) hibridar el(los) amplicón(es) marcado(s) a un conjunto de perlas de reactantes en los que cada miembro del conjunto de perlas comprende una molécula de ácido nucleico que tiene complementariedad con una secuencia de nucleótidos del analito o una cepa particular del analito, unida o asociada de otro modo con una perla distinguible fisiológicamente; y
- 65 (vii) determinar a cuál de los reactantes se ha unido un amplicón;

en el que la asociación de un amplicón con un reactante particular es indicativa de una infección por el analito en el sujeto.

5 Tal como se usa en este documento, el término "sujeto" se refiere cualquier organismo que pueda ser susceptible de
 10 infección por otro analito. Como tal, un "sujeto" incluye, pero no se limita a animales, plantas, hongos y bacterias
 (que pueden ser infectadas por un bacteriófago). Tal como se usa en este documento, el término "animal" incluye,
 con preferencia, un mamífero y, con más preferencia, un primate incluyendo un primate inferior y, con más
 15 preferencia aún, un ser humano. Sin embargo, el término "animal" también incluye específicamente especies de
 ganado tales como reses, caballos, ovejas, cerdos, cabras y burros así como animales de laboratorio. Los ejemplos
 de animales de ensayo de laboratorio incluyen ratones, ratas, conejos, cobayas y hámsteres. Los conejos y
 animales roedores, tales como ratas y ratones, proporcionan un sistema de prueba o modelo animal conveniente
 como lo hacen los primates y los primates inferiores. También están contemplados animales no mamíferos tales
 como especies aviares, pez cebra, anfibios (incluidos sapos de caña) y especies *Drosophila* tales como la
 20 *Drosophila melanogaster*.

15 El "sujeto" también puede ser no animal, tal como una planta. El término "planta" incluye específicamente plantas de
 valor agrícola tales como plantas de cereales (por ejemplo, trigo, cebada, avena, centeno, triticale y maíz), arroz,
 árboles frutales (por ejemplo, manzanos, bananos, mangos y naranjos), caña de azúcar, plantas de cultivo hortícolas
 (por ejemplo, patatas, zanahorias y cebollas) y similares.

20 Sin embargo, en una realización preferida, la presente invención proporciona un método para diagnosticar la
 infección por VPH en un sujeto humano, comprendiendo dicho método:

- 25 (i) obtener una muestra biológica del sujeto humano que comprende supuestamente el VPH;
- (ii) aislar el ácido nucleico de dicha muestra;
- (iii) amplificar el ácido nucleico de dicha muestra usando cebadores que generan un amplicón que es distinto para
 30 dicho analito o una cepa particular de dicho analito;
- (iv) amplificar opcionalmente una secuencia de ácido nucleico de control del ADN genómico del sujeto humano;
- (v) efectuar opcionalmente el marcado del(los) amplicón(es) enumerado(s) en las etapas (iii) y/o (iv);
- 35 (vi) hibridar el(los) amplicón(es) marcado(s) a un conjunto de perlas de reactantes en los que cada miembro del
 conjunto de perlas comprende una molécula de ácido nucleico que tiene complementariedad con una secuencia de
 nucleótidos del VPH o una cepa del VPH particular, unida o asociada de otro modo con un sustrato distinguible
 fisicoquímicamente; y
- 40 (vii) determinar a cuál de los reactantes se ha unido un amplicón;

en el que la asociación de un amplicón con un reactante particular es indicativa de infección por VPH en el sujeto humano.

45 En un aspecto relacionado, la presente invención también contempla un método para determinar el riesgo de que un
 sujeto humano desarrolle una enfermedad asociada con una o más cepas del VPH, comprendiendo dicho método:

- (i) obtener una muestra biológica del sujeto humano que comprende supuestamente el VPH;
- 50 (ii) aislar el ácido nucleico de dicha muestra;
- (iii) amplificar el ácido nucleico de dicha muestra usando cebadores que generan un amplicón que es distinto para
 dicho analito o una cepa particular de dicho analito;
- 55 (iv) amplificar opcionalmente una secuencia de ácido nucleico de control del ADN genómico del sujeto humano;
- (v) efectuar opcionalmente el marcado del(los) amplicón(es) enumerado(s) en las etapas (iii) y/o (iv);
- 60 (vi) hibridar el(los) amplicón(es) marcado(s) a un conjunto de perlas de reactantes en los que cada miembro del
 conjunto de perlas comprende una molécula de ácido nucleico que tiene complementariedad con una secuencia de
 nucleótidos del VPH o una cepa del VPH particular, unida o asociada de otro modo con un sustrato distinguible
 fisicoquímicamente; y
- (vii) determinar a cuál de los reactantes se ha unido un amplicón;
- 65

en el que la asociación de un amplicón con un reactante particular que comprende un polinucleótido que es

complementario a una cepa del VPH asociada con una enfermedad particular, es indicativa de un aumento del riesgo de dicha enfermedad en el sujeto.

5 Se prefiere el marcado de los amplicones como se indica en la parte (v): Por tanto, se marcan tanto los amplicones como las perlas.

10 Las enfermedades ejemplares asociadas con una o más cepas del VPH particulares incluyen las presentadas en la tabla 3. Por consiguiente, en este aspecto, la presente invención proporciona un método para diagnosticar un aumento del riesgo de que un sujeto desarrolle una enfermedad particular identificando específicamente qué cepa del VPH está infectando al sujeto. En una realización particularmente preferida, el método está adaptado para determinar el riesgo de que un sujeto humano desarrolle cáncer de cuello uterino.

15 La presente invención contempla además un kit de diagnóstico para su uso según los métodos descritos en este documento, incluyendo diagnosticar una infección por el VPH en un sujeto a humano y/o evaluar el riesgo de que un sujeto humano desarrolle una enfermedad asociada con el VPH, incluyendo cáncer de cuello uterino. El kit comprende un conjunto de perlas de reactantes que comprenden cada uno un polinucleótido que es complementario con una secuencia de nucleótidos de una cepa del VPH particular, unida o asociada de otro modo con un sustrato distinguible fisicoquímicamente. Opcionalmente, el kit también puede comprender unir cebadores que se unen a secuencias conservadas entre diferentes cepas del VPH, pero generan un amplicón que comprende una secuencia de nucleótidos distinta para cada cepa del VPH en los que el amplicón generado es supuestamente complementario con un polinucleótido unido a, o asociado de otro modo con una o más perlas que distinguibles fisicoquímicamente del kit.

25 En una realización preferida, el conjunto de perlas de reactantes comprende al menos grupos de perlas, comprendiendo cada uno un diámetro de uno cualquiera de aproximadamente 3,0 μm , aproximadamente 3,5 μm , aproximadamente 4,1 μm , aproximadamente 5,0 μm , aproximadamente 5,6 μm y aproximadamente 6,8 μm . En una realización preferida adicional, cada grupo de tamaño de perlas comprende uno o más subgrupos de microesferas cada uno con una marca fluorescente en un intervalo de intensidades diferentes. Con más preferencia, la marca fluorescente es TMR y se aplica a intensidades de aproximadamente el 0 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 100 %.

En una realización preferida adicional, el kit comprende los cebadores GP5+ y GP6+ y opcionalmente los cebadores LC1_F y LC1_R.

35 El kit también puede ser en forma de un chip o soporte de fase sólida, denominado comúnmente biochip. Todos o parte de los reactivos usados en el ensayo objeto pueden incorporarse en un biochip o miniaturizarse en un nanoensayo. Aunque la citometría de flujo es particularmente útil en la medida de los rendimientos del ensayo objeto, el biochip puede usarse para medir o automatizar otras señales tales como las asociadas con ensayos en modo de galería susurrante.

40 A pesar de que las intensidades fluorescentes es un aspecto preferido del método de multiplexación, otras formas de identificación están englobadas por la presente invención. Uno de tales métodos alternativos incluye la detección en modo de galería susurrante (WGM). En esta realización, un marcador fluorescente se incorpora en perlas de un subconjunto o se incorpora o se une a ADN sobre la superficie de las perlas. Este marcador fluorescente puede excitar los WGM con un láser o fuente de luz blanca desenfocada o con fuente de luz blanca desenfocada filtrada.

50 Los WGM permiten que sólo se emitan desde la partícula determinadas longitudes de onda de luz. El resultado de este fenómeno es que las bandas de emisión anchas normales (10-100 nm de anchura) de, por ejemplo, un fluoróforo se restrinjan y aparezcan como una serie picos agudos que corresponden eficazmente a patrones de luz de modo permanente dentro de la partícula. De acuerdo con la presente invención, se ha determinado que el perfil de WGM es extremadamente sensible a cambios en la superficie de la partícula microesferoide y que el perfil de WGM cambia cuando la partícula microesferoide interacciona con analitos o moléculas dentro de su entorno.

55 Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención contempla un método de detección de un analito tal como un amplicón de una cepa del VPH que comprende una secuencia específica de una cepa, comprendiendo dicho método poner en contacto al menos un conjunto de partículas microesferoides con una muestra que comprende supuestamente dicho analito, en el que cada partícula dentro de un conjunto de partículas microesferoides comprende una marca ópticamente detectable y un supuesto compañero de unión inmovilizado de dicho analito (por ejemplo, un cebador o una sonda capaz de unir, capturar o inmovilizar de otro modo un amplicón de una cepa del VPH) en el que cada conjunto de partículas tiene un perfil de WGM definido, en el que la unión de dicho analito a dicho compañero de unión inmovilizado tiene como resultado un cambio en dicho perfil de WGM de dicho al menos un conjunto de partículas microesferoides que es indicativo de la presencia de dicho analito.

65 Los métodos de la presente invención pueden aplicarse para detectar la modulación en el perfil de WGM de una partícula microesferoide en los que dicha modulación resulta de la detección de la unión u otra asociación de moléculas en una muestra para la unión potencial de partículas inmovilizadas a la superficie de la partícula

microesferoide. La detección de reacciones de unión entre un analito y su compañero de unión basándose en cambios sensibles en los perfiles de WGM permite la identificación y el aislamiento de los analitos.

5 Una característica de la presente invención es que las partículas microesferoides pueden ser excitadas con una amplia gama de fuentes de luz, facilitando la medida en muchos perfiles de WGM diferentes.

10 Una "marca ópticamente detectable" puede ser cualquier molécula, átomo o ion que emite fluorescencia, fosforescencia y/o incandescencia. En una realización preferida de la presente invención, la marca ópticamente detectable es un fluoróforo, que puede englobar una gama de marcas ópticamente detectables tales como fluoróforos y colorantes químicos así como puntos cuánticos.

15 En una realización específica, la presente invención proporciona una partícula microesferoide que comprende una partícula de látex o sílice que es de 1µm a 100 µm de diámetro, marcada con una marca ópticamente detectable, tal como un fluoróforo o un punto cuántico, comprendiendo además la partícula un supuesto compañero de unión de un analito que ha de detectarse. Un ejemplo es una molécula de ácido nucleico de captura capaz de unirse a un amplicón de VPH generado por la amplificación usando dos cebadores para una región conservada del genoma del VPH que flanquea una región específica de una cepa. La marca ópticamente detectable es detectable a longitudes de onda visible y la partícula microesferoide presenta uno o más perfiles de WGM. Uno o más de los perfiles de WGM de la partícula microesferoide modula de manera detectable cuando el analito interactúa con el compañero de unión inmovilizado en la partícula. Cualquier de tales cambios en el perfil de WGM es indicativo de la presencia de un analito que se ha unido a su compañero de unión.

La presente invención se describe además por los siguientes ejemplos no limitativos:

25 **Ejemplo 1**

Diagnóstico del VPH - Aislamiento y amplificación de ADN

30 En la figura 2 se muestra una perspectiva general del protocolo de extracción de ADN usado para aislar ADN para el método de diagnóstico del VPH.

35 Tal como se muestra en la figura 3, se usó PCR para amplificar la muestra de ADN. Se usaron los cebadores GP5+ y GP6+ para generar un amplicón para cualquier cepa del VPH que estuviera presente en la muestra de ADN. El cebador GP6+ comprendió una marca fluorescente, específicamente Cy5 para permitir la visualización posterior de la unión de amplicón a los agentes de unión. Los amplicones víricos generados comprendieron tanto una región conservada (Y) que se conserva entre todas las cepas del VPH examinadas como una región que es variable (es decir, específica de una cepa) entre cepas del VPH, X_n, donde n representa una región variable asociada con cada cepa del VPH. Los compañeros de unión inmovilizados en perlas se unen específicamente al genoma específico de una cepa del VPH.

40 Además, también se generó un amplicón a partir del ADN genómico del sujeto humano usando los cebadores LC1_F y LC1_R para servir como control. En este caso, el cebador LC1_R también llevaba una marca Cy5.

45 **Ejemplo 2**

Diagnóstico del VPH - Detección múltiple

50 Los amplicones generados en el ejemplo 1 fueron hibridados a una matriz de agentes de unión, llevando cada uno un polinucleótido que es complementario a la región variable del supuesto amplicón vírico generado a partir de cada una de las cepas del VPH c, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67 y 68 (X₁ a X₁₆). Véase la figura 9 para las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos de captura inmovilizados en las perlas. Además, la matriz comprende un agente de unión que comprende un polinucleótido que es complementario a la región conservada de los amplicones víricos del VPH (Y). Por último, se incluye un agente de unión que comprende un polinucleótido que es complementario a la secuencia del amplicón de control humano. El ácido nucleico de captura puede ser ADN o ARN. Si se usa ARN, puede requerirse una transcriptasa inversa para generar ARN a partir del amplicón de ADN.

60 Cada uno de los agentes de unión en la matriz comprende una microesfera o perla con un tamaño distinto e intensidad distinta de la marca fluorescente (TMR). Las perlas que comprenden diámetros de 3,0 µm, 3,5 µm, 4,1 µm, 5,0 µm, 5,6 µm y 6,8 µm pueden diferenciarse unas de otras usando citometría de flujo, tal como se muestra en la figura 4.

65 Para cada tamaño de microesfera dado, se incorporó una marca fluorescente (TMR) a intensidades relativas del 0 %, 4 %, 20 % y 100 %. Estas intensidades de marca pudieron distinguirse claramente usando citometría de flujo tal como se muestra en la figura 5. En la figura 1 se muestra una máquina para leer las intensidades.

La figura 6 es un diagrama esquemático que muestra cada uno de los agentes de unión usados en la matriz. Como

puede observarse, la matriz usaba microesferas que comprenden diámetros de 3,0 µm, 3,5 µm, 4,1 µm, 5,0 µm, 5,6 µm y 6,8 µm e intensidades de señal de marca fluorescente del 0 %, 4 %, 20 % y 100 %. Sin embargo, en el caso de los tamaños de perla más pequeños, se usaron menos clases de intensidad de señal. La figura 7 muestra cómo se distingue cada uno de estos agentes de unión basándose tanto en el tamaño como en la intensidad de marca fluorescente.

La figura 8 muestra la asociación de amplicones unidos con tres agentes de unión específicos en la matriz. En esta figura, se muestra que un amplicón se une al control de DNA humano (Z), la secuencia vírica conservada (Y) y la secuencia variable vírica X₇, lo cual es indicativo de la presencia de la cepa del VPH 18 en la muestra.

Ejemplo 3

Comparación del método de detección múltiplex con diagnóstico tradicional del VPH

La tabla 5, a continuación, proporciona una visión general que compara el método de detección multiplex del VPH de la presente invención con el método histológico actual para diagnóstico del VPH.

Tabla 5

Comparación de métodos de diagnóstico del VPH			
Método de diagnóstico del VPH	Rendimiento	Informe	Controles
Presente invención	1600 por día, por instrumento	Las 13 cepas de "alto riesgo" identificadas individualmente	control interno, control positivo, control de ADN humano
Método basado en histología	350 por día	Clase de "alto riesgo" generalmente identificada	sin control interno, control positivo de "bajo riesgo", control positivo de "alto riesgo"

Ejemplo 4

Detección del VPH en muestras humanas

Las figuras 10A a G proporcionan ejemplos en los que se detecta el VPH o se menciona su ausencia en muestras humanas.

Los expertos en la materia apreciarán que la invención descrita en este documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Ha de entenderse que la invención incluye todas estas variaciones y modificaciones. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos referidos o indicados en esta memoria descriptiva, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones de cualquiera o más de dichas etapas o características.

Bibliografía

- Bonner y Laskey, Eur. J. Biochem. 46:83, 1974
- Chadwick y col., J. Virol. Methods 70:59-70, 1998
- Chan y Fox, Rev. Med. Microbiol. 10:185-196, 1999
- Compton, Nature 350:91-92, 1991
- Demidov y Broude (Eds.), "DNA Amplification: Current Technologies and Applications", Horizon Bioscience, 2004
- Gearhart y col., www.emedicine.com/MED/topic1037.htm, 2004
- Guatelli y col., Proc. Natl Acad. Sci. USA 87:1874-1878, 1990
- Hill, J. Clin. Ligand Assay 19:43-51, 1996
- Kievits y col., J. Virol. Methods 35:273-286, 1991
- Kuske y col., Appl. Environ. Microbiol. 64(7):2463-2472, 1998

Lizardi y col., *Biotechnology* 6:1197-1202, 1988

Lyamichev y col., *Nat. Biotechnol.* 17:292-296, 1999

5

Marmur y Doty, *J. Mol. Biol.* 5:109, 1962

Nelson y Krawetz, *Anal. Biochem.* 207(1):97-201, 1992

10

Pawlotsky y col., *J. Virol. Methods* 79:227-235, 1999

Ryan y col., *Mol. Diagn.* 4:135-144, 1999

Speel, *Histochem. Cell Biol.* 112:89-113, 1999

15

Todd y col., *J. AIDS Hum. Retroviral.* 10:S35-S44, 1995

Listado de secuencias

20

<110> Genera Biosystems Pty Ltd POETTER, Karl (SÓLO EE.UU.) GOULD, Toby (SÓLO EE.UU.)

<120> Composiciones y métodos de detección

<130> 12701060/EJH

<150> AU 2004907070

<151> 2004-12-10

25

<150> US 60/704,974

<151> 2005-08-03

<160> 26

<170> Versión PatentIn 3.1

<210> 1

30

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> artificial

35

<400> 1

ttgttactg tgtagatac tac

<210> 2

<211> 25

<212> ADN

40

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> artificial

<400> 2

gaaaaataaa ctgtaaatca tattc

45

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50

<223> artificial

<400> 3

tacacacagg tgtacacaga

<210> 4

<211> 20

55

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> artificial

<400> 4

60

accaagtact ctacgtgtg

<210> 5

<211> 65

<212> ADN

<213> cebador VPH sintético

65

<400> 5

23

25

20

20

ES 2 524 050 T3

	aattaaccct cactaaaggg aggacagcta tggacatccg taactacatc ttccacatac	60
	accaa	65
	<210> 6	
	<211> 70	
	<212> ADN	
5	<213> cebador VPH sintético	
	<400> 6	
	aatggaatta accctcacta aagggaggac agctatggac atctgtgtct aaatctgcta	60
	catacactaa	70
	<210> 7	
	<211> 70	
10	<212> ADN	
	<213> cebador VPH sintético	
	<400> 7	
	aatggaatta accctcacta aagggaggac agctatggac tgtttgtgct gcaattgcaa	60
	acagtgatac	70
	<210> 8	
15	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> cebador VPH sintético	
	<400> 8	
	aatggaatta accctcacta aagggaggac agctatggac tttatgcaca caagtaacta	60
	gtgacagtac	70
20	<210> 9	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> cebador VPH sintético	
	<400> 9	
	aatggaatta accctcacta aagggaggac agctatggac gtctgtgtgt tctgctgtgt	60
25	cttctagtga	70
	<210> 10	
	<211> 65	
	<212> ADN	
	<213> cebador VPH sintético	
30	<400> 10	
	aattaaccct cactaaaggg aggacagcta tggactctac ctctatagag tcttccatac	60
	cttct	65
	<210> 11	
	<211> 65	
	<212> ADN	
35	<213> cebador VPH sintético	
	<400> 11	
	aattaaccct cactaaaggg aggacagcta tggacacaca aaatcctgtg ccaagtacat	60
	atgac	65
	<210> 12	
	<211> 65	
40	<212> ADN	

ES 2 524 050 T3

	<213> cebador VPH sintético <400> 12	aattaaccct cactaaaggg aggacagcta tggacagcac tgccactgct gcggtttccc	60
		caaca	65
5	<210> 13 <211> 65 <212> ADN <213> cebador VPH sintético <400> 13	aattaaccct cactaaaggg aggacagcta tggactgctg aggttaaaaa ggaaagcaca	60
		tataa	65
10	<210> 14 <211> 65 <212> ADN <213> primer HPV synthetic <400> 14	aattaaccct cactaaaggg aggacagcta tggacgtact gctacagaac agttaagtaa	60
		atatg	65
15	<210> 15 <211> 70 <212> ADN <213> cebador VPH sintético		
20	<400> 15	aatggaatta accctcacta aaggaggac agctatggac attatgcact gaagtaacta	60
		aggaaggtac	70
25	<210> 16 <211> 65 <212> ADN <213> cebador VPH sintético <400> 16	aattaaccct cactaaaggg aggacagcta tggactctac tacttcttct attcctaatg	60
		tatac	65
30	<210> 17 <211> 65 <212> ADN <213> cebador VPH sintético <400> 17	aattaaccct cactaaaggg aggacagcta tggactctac tactactgaa tcagctgtac	60
		caaat	65
35	<210> 18 <211> 65 <212> ADN <213> cebador VPH sintético <400> 18	aattaaccct cactaaaggg aggacagcta tggacgtcat tatgtgctgc catatctact	60
		tcaga	65
40	<210> 19		

ES 2 524 050 T3

	<211> 65		
	<212> ADN		
	<213> cebador VPH sintético		
	<400> 19		
	aattaaccct cactaaaggg aggacagcta tggactgctt ctacacagtc tcctgtacct		60
5	gggca		65
	<210> 20		
	<211> 51		
	<212> ADN		
	<213> cebador VPH sintético		
10	<400> 20		
	aaagggagga cagctatgga ctattaatgc agctaaaagc acattaacta a		51
	<210> 21		
	<211> 51		
	<212> ADN		
15	<213> cebador VPH sintético		
	<400> 21		
	aaagggagga cagctatgga ccaaacacag acacagagag acccacagac a		51
	<210> 22		
	<211> 58		
20	<212> ADN		
	<213> cebador VPH sintético		
	<400> 22		
	aattaaccct cactaaaggg aggacagcta tggactttgt tactgtgga gatactac		58
	<210> 23		
25	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> cebador VPH sintético		
	<400> 23		
	tacacacagg tgtacacaga		20
30	<210> 24		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> cebador VPH sintético		
	<400> 24		
35	accaagtact ctacgtgtg		20
	<210> 25		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> cebador VPH sintético		
40	<400> 25		
	tttkttachg tkgtgdgatac yac		23
	<210> 26		
	<211> 25		
	<212> ADN		
45	<213> cebador VPH sintético		
	<400> 26		
	gaaahataaa ytgyaadtca taytc		25

REIVINDICACIONES

1. Un conjunto de perlas para detectar una cepa del VPH y/o para diferenciar entre dos o más cepas del VPH, en el que el conjunto de perlas comprende una pluralidad de subconjuntos de perlas específicos de una cepa del VPH en el que:
- 5 (a) las perlas de cada subconjunto son homogéneas con respecto al tamaño;
- (b) las perlas dentro de cada subconjunto específico de una cepa del VPH se enlazan químicamente a una sonda de captura de ácido nucleico que es capaz de unirse a una región específica de una cepa del VPH de un genoma del VPH;
- 10 (c) cada subconjunto de perlas es distinguible en virtud de diferencias mensurables en el tamaño de la perla, la presencia o ausencia de una marca ópticamente detectable, y la intensidad de marca ópticamente detectable, en el que la marca ópticamente detectable está provista en la sonda de captura en cada perla; y
- 15 (d) se mezclan entre sí al menos dos subconjuntos de perlas, con una sonda de captura de ácido nucleico seleccionada de la lista constituida por los SEQ ID NO: 5 a 20, para producir un conjunto de perlas, en el que la identidad del subconjunto y, por lo tanto, la cepa del VPH es identificable por citometría de flujo basándose en el tamaño, la intensidad de marca y la discriminación de secuencias.
- 20 2. El conjunto de perlas de la reivindicación 1, en el que las sondas marcadas y no marcadas se mezclan en diferentes proporciones y se conjugan con las perlas.
- 25 3. El conjunto de perlas de la reivindicación 1 ó 2, en el que la cepa del VPH se selecciona de las cepas 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68.
4. El conjunto de perlas de la reivindicación 3, en el que la cepa del VPH se selecciona de la 6, 11, 31 y 33.
- 30 5. El conjunto de perlas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende 16 subconjuntos de perlas específicos de una cepa del VPH, cada uno con una sonda de captura de ácido nucleico seleccionada de la lista constituida por los SEQ ID NO: 5 a 20.
- 35 6. El conjunto de perlas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los tamaños de perla se seleccionan del grupo constituido por 3,0 µm, 3,5 µm, 4,1 µm, 5,0 µm, 5,6 µm y 6,8 µm.
7. El conjunto de perlas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las perlas se marcan con un fluorocromo seleccionado del grupo constituido por hidroxycumarina, aminocumarina, metoxicumarina, azul cascada, amarillo Lucifer, NBD, ficoeritrina (PE), PerCP, aloficocianina, Hoechst 33342, DAP1, azul SYTOX, Hoechst 33258, cromomicina A3, mitramicina, YOYO-1, verde SYTOX, naranja SYTOX, 7-AAD, naranja de acridina, TOTO-1, To-PRO-1, naranja de tiazol, TOTO-3, TO-PRO-3, LDS 751, colorantes Alexa Fluor incluyendo Alexa Fluoro-350, -430, -488, -532, -546, -555, -556, -594, -633, -647, -660, -680, -700 y -750; colorantes BoDipy, incluyendo BoDipy 630/650 y BoDipy 650/665; colorantes CY, en particular Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy 5.5 y Cy7; 6-FAM (fluoresceína); PE-Cy5, PE-Cy7, fluoresceína dT; hexaclorofluoresceína (Hex); 6-carboxi-4', 5'-dicloro-2', 7'-dimetoxifluoresceína (JOE); colorantes Oregon Green, incluyendo 488-X y 514; colorantes de rodamina, incluyendo X-rodamina, lisamina rodamina B, verde de rodamina, rojo de rodamina y ROX; TRITC, tetrametilrodamina (TMR); carboxitetrametilrodamina (TAMRA); tetraclorofluoresceína (TET); Rojo 6B, FluorX, BODIPY-FL, colorante SYBR Green I, y Texas Red.
- 40 8. Un método para preparar el conjunto de perlas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo el método seleccionar una pluralidad de subconjuntos de perlas tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, por medio del cual se mezclan entre sí al menos dos subconjuntos de perlas para producir un conjunto de perlas, en el que la identidad del subconjunto y, por lo tanto, la cepa del VPH es identificable por citometría de flujo basándose en el tamaño, la intensidad de marca y la discriminación de secuencias.
- 50 55 9. Un método para diagnosticar una infección por VPH en un sujeto humano, comprendiendo dicho método:
- (i) aislar el ácido nucleico de una muestra procedente del sujeto humano que comprende supuestamente el VPH;
- 60 (ii) amplificar el ácido nucleico de dicha muestra usando cebadores que generan un amplicón que es distinto para dicho analito o una cepa particular de dicho analito;
- (iii) amplificar opcionalmente una secuencia de ácido nucleico de control del ADN genómico del sujeto humano;
- 65 (iv) efectuar el marcado del(los) amplicón(es) enumerado(s) en las etapas (ii) y/o (iii);

(v) hibridar el(los) amplicón(es) marcado(s) a un conjunto de perlas tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y

5 (vi) determinar a cuál de los reactantes se ha unido un amplicón; en el que la asociación de un amplicón con un reactante particular es indicativa de una infección por VPH en el sujeto humano.

10. Uso del conjunto de perlas se una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la fabricación de un agente de diagnóstico para diagnosticar el VPH y/o diferenciar entre dos o más cepas del VPH.

10 11. Un método para detectar y/o diferenciar entre una o más cepas particulares del VPH en una muestra biológica, comprendiendo dicho método las etapas de:

15 (i) aislar el ácido nucleico de la muestra biológica procedente del sujeto humano que comprende supuestamente el VPH;

(ii) amplificar el ácido nucleico de dicha muestra usando cebadores que generan un amplicón que es distinto para cada cepa del VPH;

20 (iii) amplificar opcionalmente una secuencia de ácido nucleico de control;

(iv) efectuar el marcado del(los) amplicón(es) enumerado(s) en las etapas (ii) y/o (iii);

(v) hibridar el(los) amplicón(es) marcado(s) a un conjunto de perlas tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y

25 (vi) determinar a cuál de los reactantes se ha unido un amplicón;

en el que la asociación de un amplicón con un reactante particular es indicativa de la presencia de una cepa particular del VPH en la muestra.

FIGURA 1

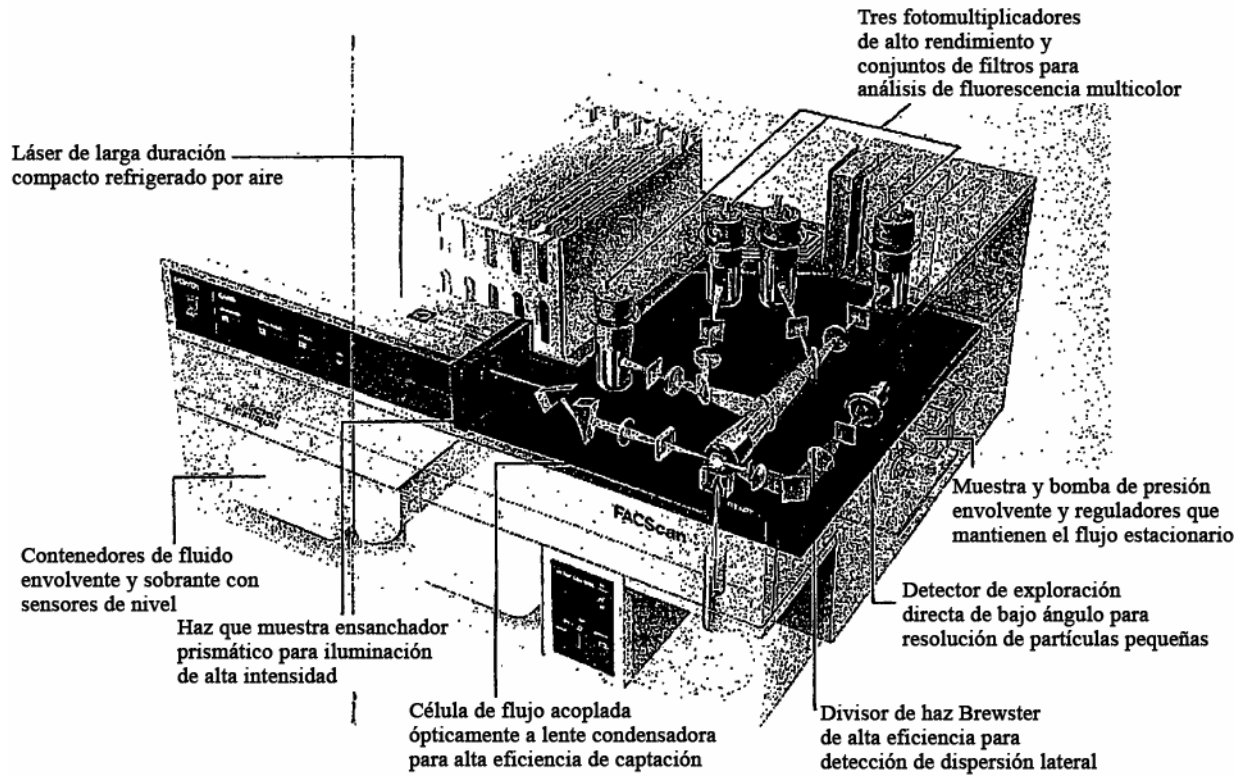


FIGURA 2

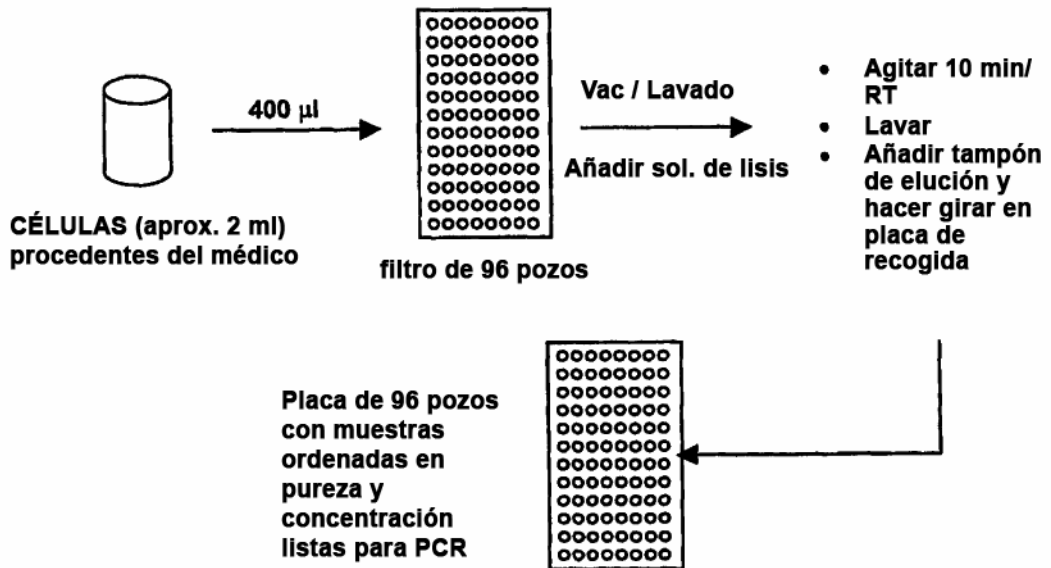


FIGURA 3

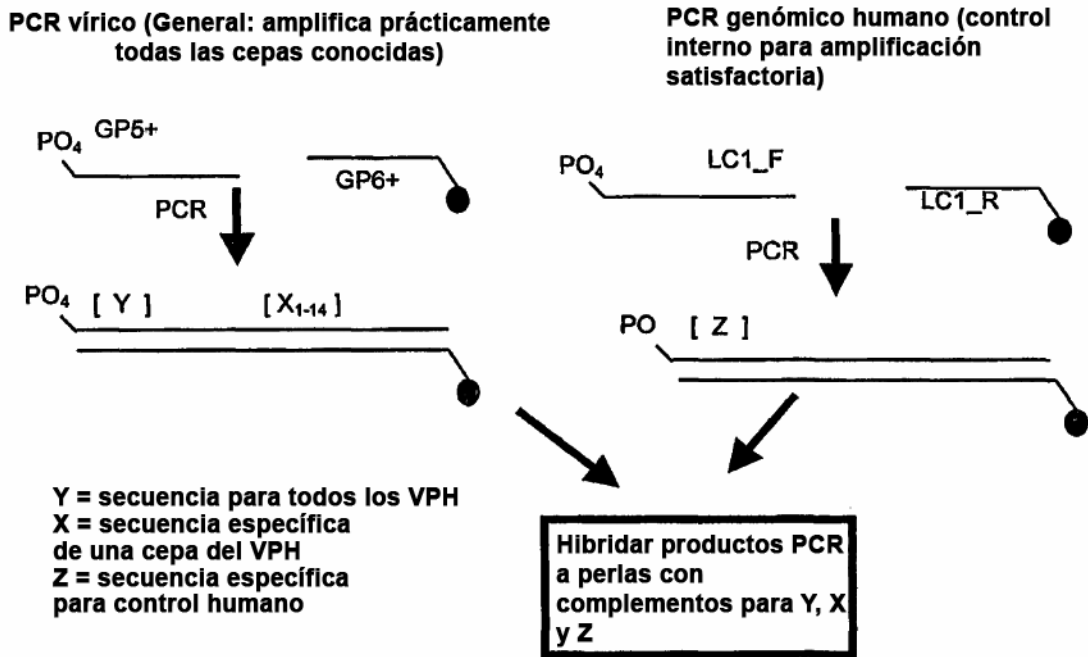


FIGURA 4

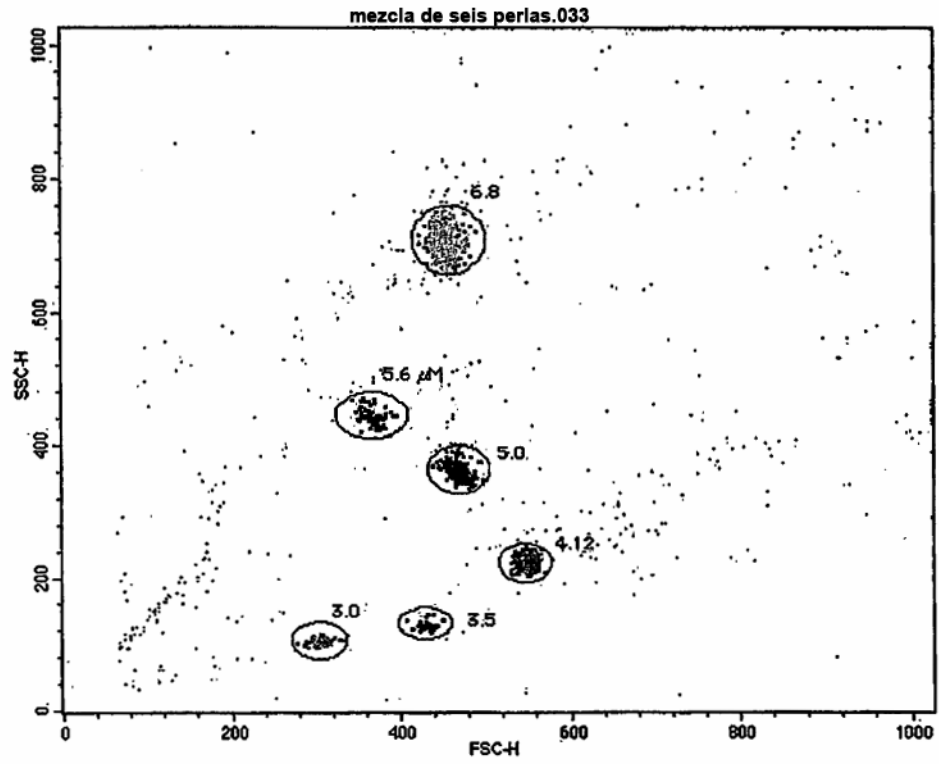
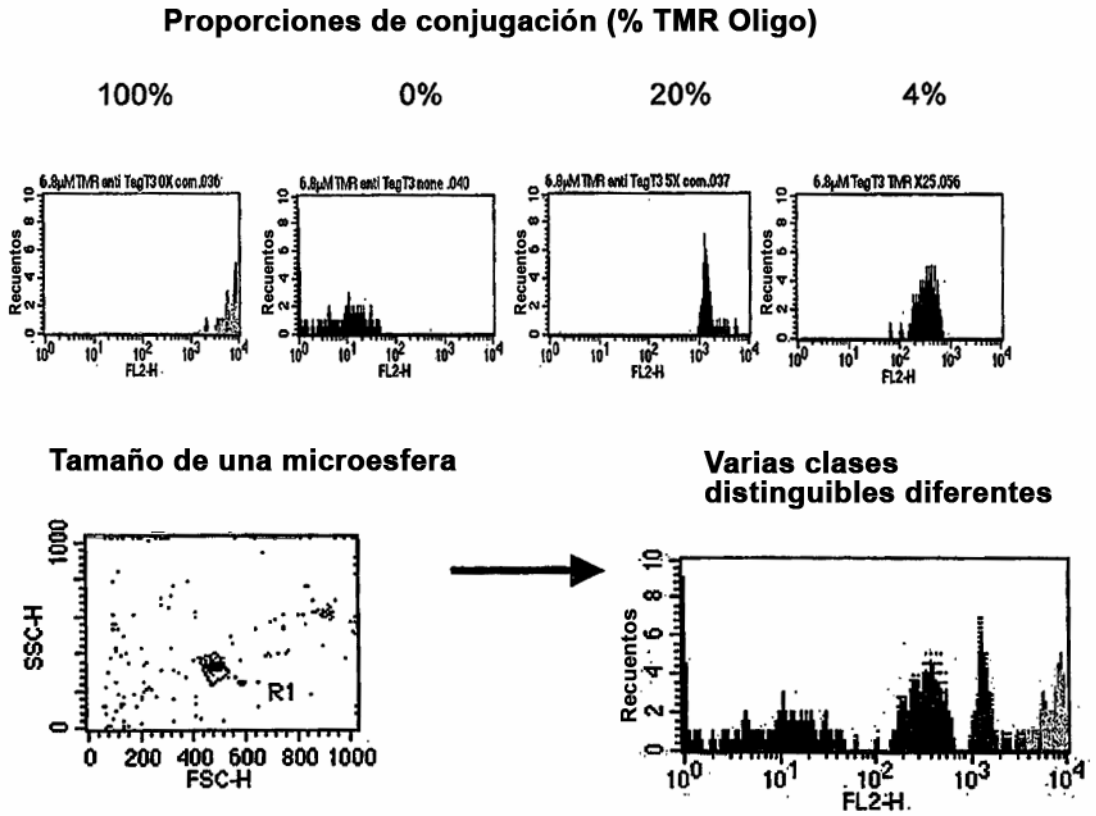


FIGURA 5



FIGURAS 6


















	Nivel de TMR			
	0	100%	20%	4%
6,8 um	 X ₁	 X ₂	 X ₃	 X ₄
5,6 um	 X ₅	 X ₆	 X ₇	 X ₈
5,0 um	 X ₁₁	 X ₉	 X ₁₀	
4,1 um	 X ₁₃	 X ₁₂		
3,5 um	 Z	 X ₁₄		
3,0 um	 X _{LR}	 Y		

FIGURA 7

Cepa	Tamaño de perla	Marcado de TMR
6	3,0um	100%
11	3,0um	0%
16	5,0um	20%
18	5,0um	100%
31	4,1um	0%
33	5,0um	0%
35	5,6um	0%
39	3,5um	100%
45	3,5um	20%
51	4,1um	20%
52	6,8um	20%
56	4,1um	100%
58	6,8um	20%
59	5,6um	20%
68	6,8um	100%
Control de VPH	5,6um	100%
Control de LC1	3,5um	0%

FIGURAS 8


















	Nivel de TMR			
	0	100%	20%	4%
6,8 um	 X ₁	 X ₂	 X ₃	 X ₄
5,6 um	 X ₅	 X ₆	 X ₇	 X ₈
5,0 um	 X ₁₁	 X ₉	 X ₁₀	
4,1 um	 X ₁₃	 X ₁₂		
3,5 um	 Z	 X ₁₄		
3,0 um	 X _{LR}	 Y		

FIGURA 9

Sonda 6	/5Acryd/AATGG/iAmMC6T/AATTAACCCCTCACT	AAAGGGAGGACAGCTATGGAC	ATCCGTAACACATCTTCCACATACACCAA
Sonda 11	/5Acryd/AATGGAATTAACCCCTCACT	AAAGGGAGGACAGCTATGGAC	ATCTGTGTCTAAATCTGCTACATACACTAA
Sonda 31	/5Acryd/AATGGAATTAACCCCTCACT	AAAGGGAGGACAGCTATGGAC	TGTTTGTGCTGCAATTGCAAAACAGTGATAC
Sonda 33	/5Acryd/AATGGAATTAACCCCTCACT	AAAGGGAGGACAGCTATGGAC	TTTATGCACACAAGTAAGTACTAGTGACAGTAC
Sonda 35	/5Acryd/AATGGAATTAACCCCTCACT	AAAGGGAGGACAGCTATGGAC	GTCTGTGTGTCTGCTGTGTCTTCTAGTGA
Sonda 39	/5Acryd/AATGG/iAmMC6T/AATTAACCCCTCACT	AAAGGGAGGACAGCTATGGAC	TCTACCTCTATAGAGTCTTCCATACCTTCT
Sonda 45	/5Acryd/AATGG/iAmMC6T/AATTAACCCCTCACT	AAAGGGAGGACAGCTATGGAC	ACACAAAATCCTGTGCCAAGTACATATGAC
Sonda 51	/5Acryd/AATGG/iAmMC6T/AATTAACCCCTCACT	AAAGGGAGGACAGCTATGGAC	AGCACTGCCACTGCTGCGGTTCCCCAACA
Sonda 52	/5Acryd/AATGG/iAmMC6T/AATTAACCCCTCACT	AAAGGGAGGACAGCTATGGAC	TGCTGAGGTTAAAAGGAAAGCACATATAA
Sonda 56	/5Acryd/AATGG/iAmMC6T/AATTAACCCCTCACT	AAAGGGAGGACAGCTATGGAC	GTACTGCTACAGAACAGTTAAGTAAATATG
Sonda 58	/5Acryd/AATGGAATTAACCCCTCACT	AAAGGGAGGACAGCTATGGAC	ATTATGCACTGAAGTAAGTAAAGGAAGGTAC
Sonda 59	/5Acryd/AATGG/iAmMC6T/AATTAACCCCTCACT	AAAGGGAGGACAGCTATGGAC	TCTACTACTTCTTCTATTCCTAATGTATAC
Sonda 68	/5Acryd/AATGG/iAmMC6T/AATTAACCCCTCACT	AAAGGGAGGACAGCTATGGAC	TCTACTACTACTGAATCAGCTGTACCBAAT
Sonda 16	/5Acryd/AATGG/iAmMC6T/AATTAACCCCTCACT	AAAGGGAGGACAGCTATGGAC	GTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGA
Sonda 18	/5Acryd/AATGG/iAmMC6T/AATTAACCCCTCACT	AAAGGGAGGACAGCTATGGAC	TGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCA
Sonda 66	/5Acryd/AATGG/iAmMC6T/	AAAGGGAGGACAGCTATGGAC	TATTAAATGCAGCTAAAAGCACATTAACATAA
MLC1_Ac	/5Acryd/	AAAGGGAGGACAGCTATGGAC	CAAACACAGACACAGAGAGACCCACAGACA
GP5+ For_Ac	/5Acryd/AATGG/iAmMC6T/AATTAACCCCTCACT	AAAGGGAGGACAGCTATGGAC	TTTGTACTGTGGTAGATACTAC
MLC1_reg_FP	/5Phos/TACACACAGGTGTACACAGA		
MLC1_reg_R	/5AmMC6/ACCAAGTACTCTACGTGTTG		
GP5d+	/5Phos/TTTKTTACHGKGTGTDGATACYAC		
GP6d+	/5AmMC6/GAAAHATAAAATGYAADTCATAYTC		

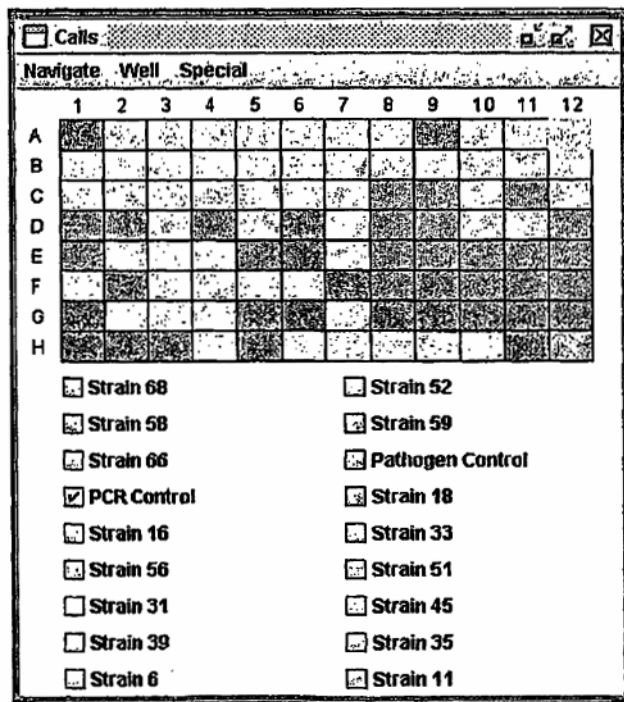
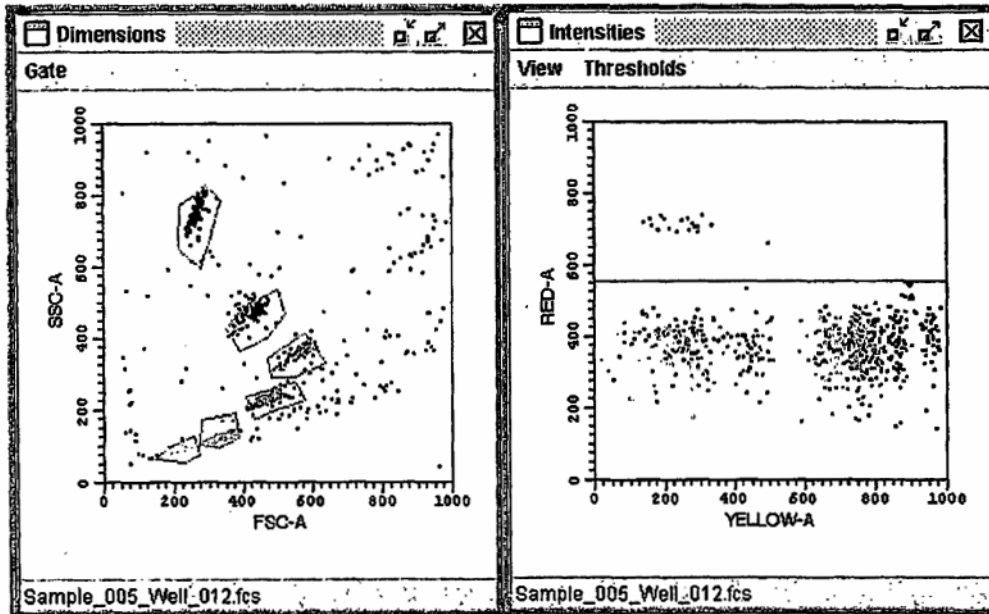


FIGURA 10A - Sólo control de PCR humano

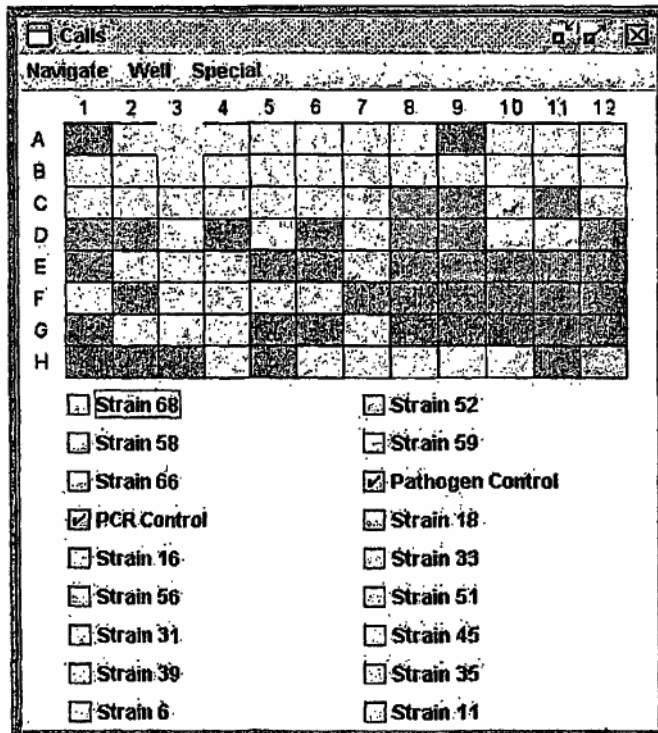
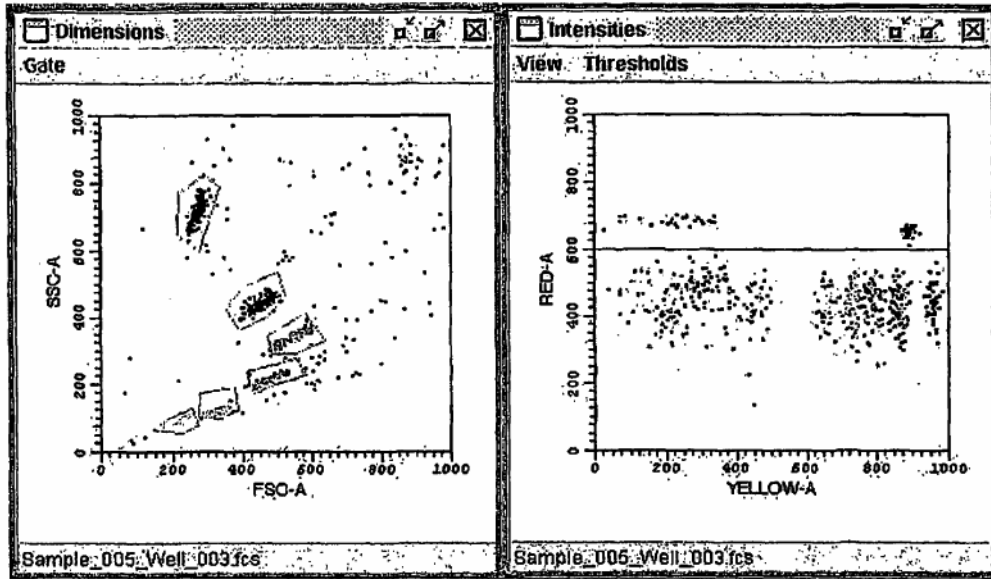


FIGURA 10B - Control humano + VPH

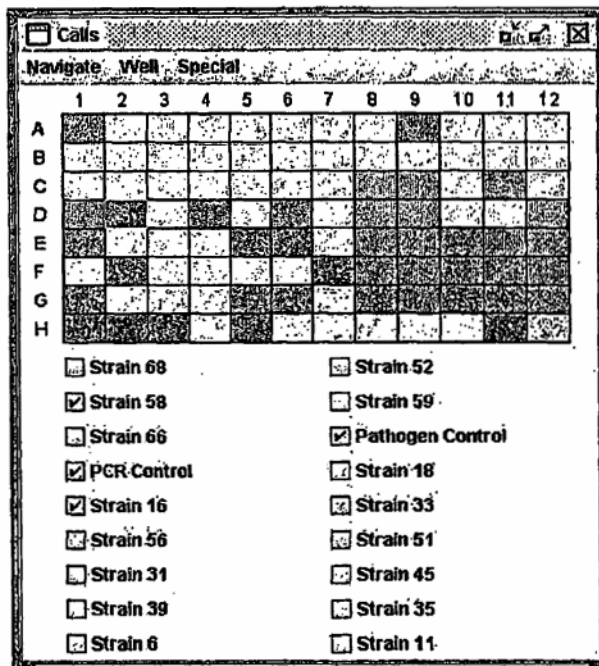
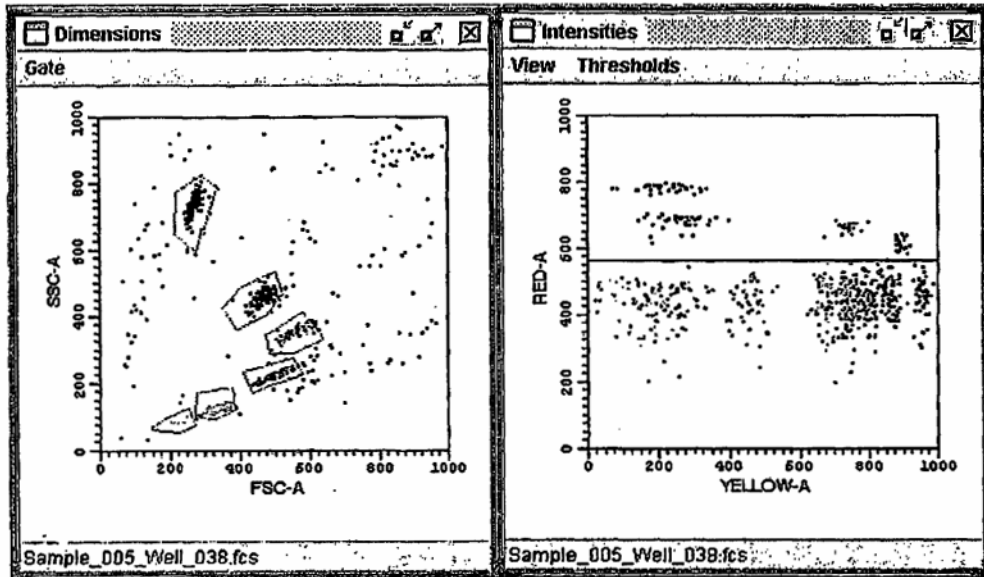


FIGURA 10C - Tipos 58 y 16

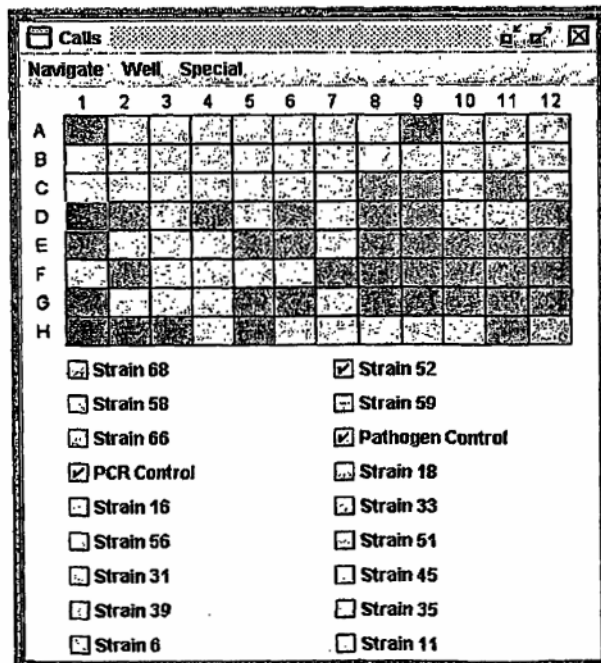
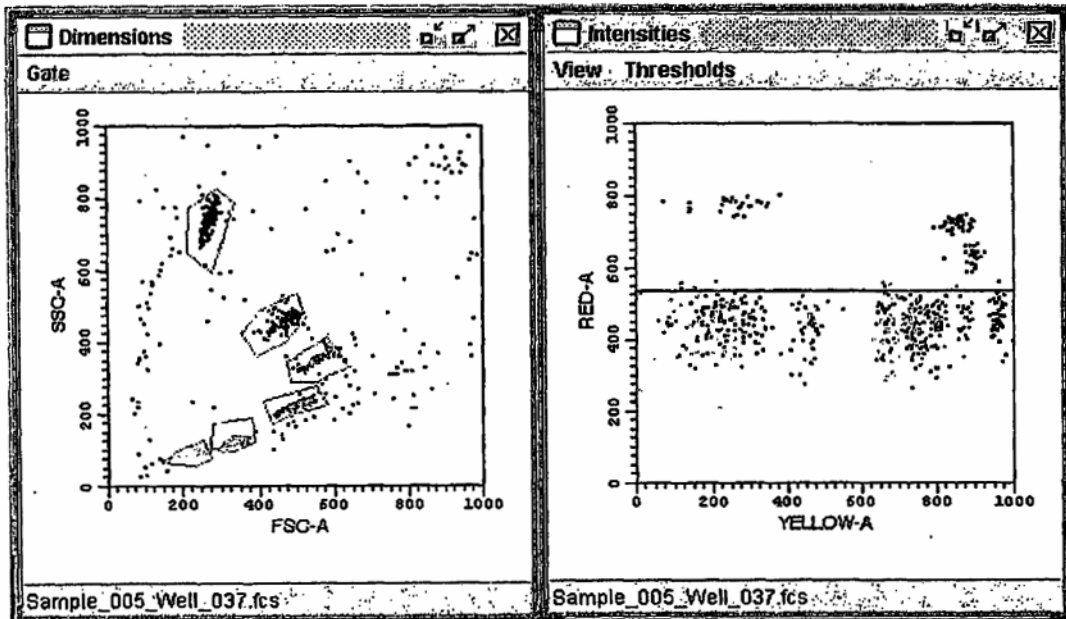


FIGURA 10E - Tipo 52

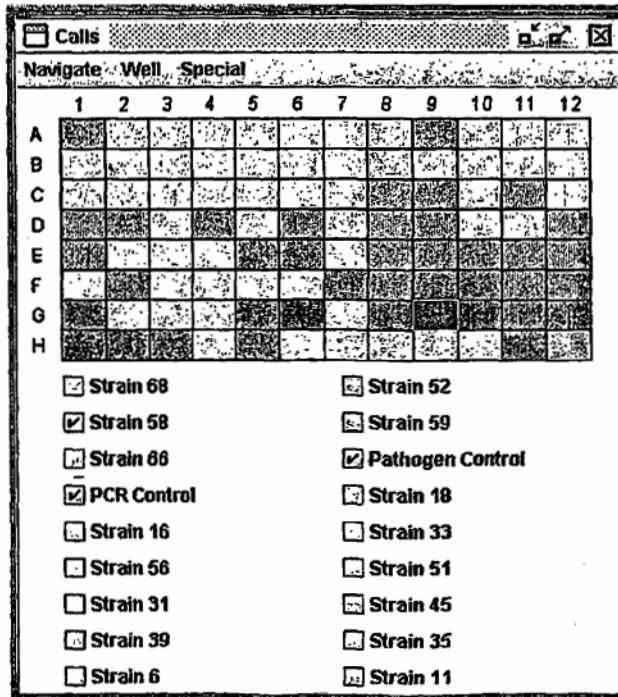
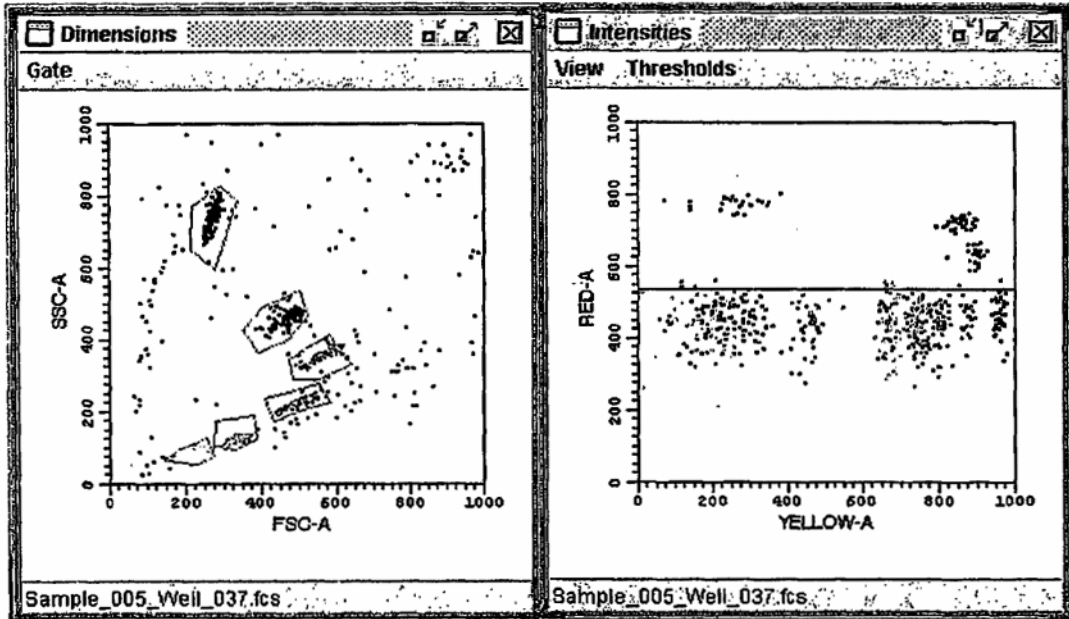


FIGURA 10F - Tipo 58

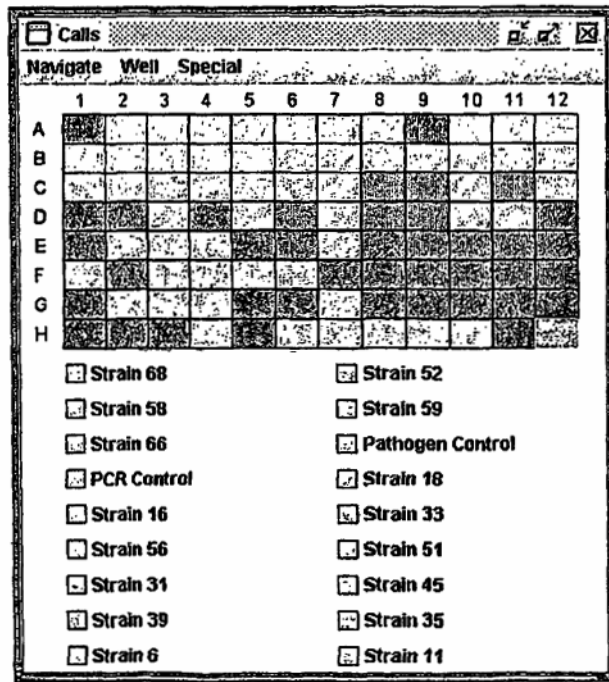
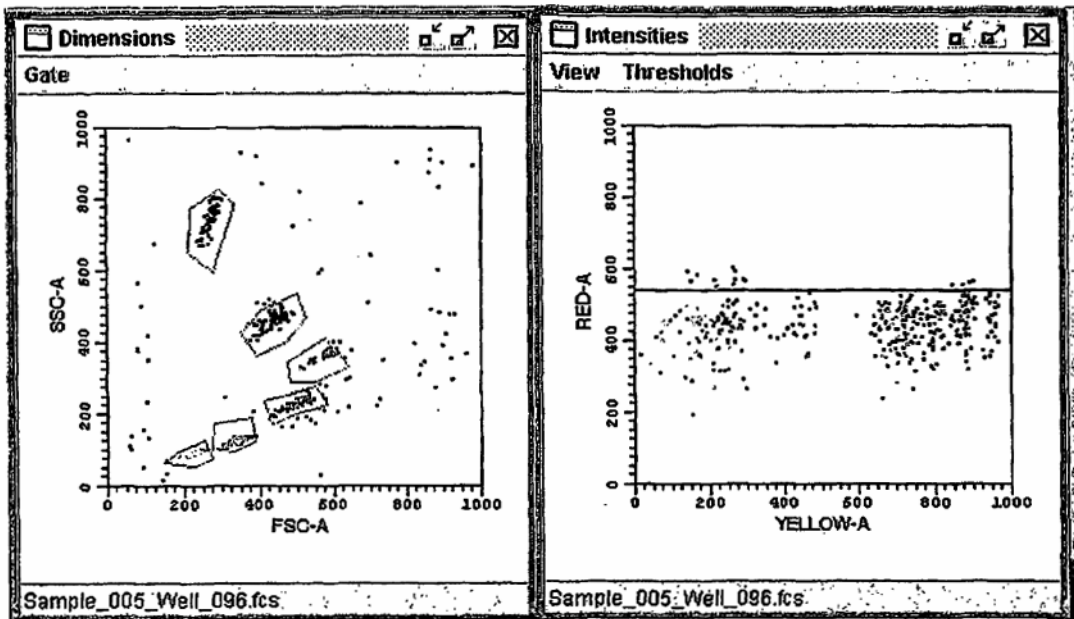


FIGURA 10G - Control negativo (no ADN)