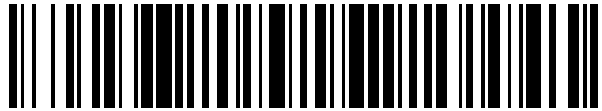


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 228**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2007** **E 07834656 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016** **EP 2209920**

54 Título: **Nuevo método de detección para los HPV cervicales**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.09.2016

73 Titular/es:

SELF-SCREEN B.V. (100.0%)
Biohof 15 1
1098 RX Amsterdam, NL

72 Inventor/es:

MEIJER, CHRISTOPHORUS, JOANNES,
LAMBERTUS, MARIA y
SNIJDERS, PETRUS, JOSEPHUS, FERDINANDUS

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 584 228 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

Nuevo método de detección para los HPV cervicales

5 La invención se refiere a la detección de virus del papiloma humano (HPV) en los cánceres cervicales, más específicamente una detección basada en las secuencias de nucleótidos de los HPV cervicales de alto riesgo.

10 La relación causal entre la infección por virus del papiloma humano de alto riesgo (hrHPV) y el cáncer de cuello uterino se hace evidente a partir de estudios epidemiológicos y funcionales (Zur Hausen, 2002, Nat. Rev. Cancer 2:342-350; Bosch y otros, 2002, J. Clin. Pathol. 55:144-265). El genoma del HPV es un ADN de 8 kb, circular, bicatenario que comprende 8 genes, todos codificados en la misma cadena. Nada menos que 200 diferentes tipos de HPV se han identificado en los seres humanos (Burd, E. M. 2003, Clin Microbiol Rev. 16:1-17); de estos aproximadamente 40 tipos han sido capaces de infectar el tracto genital. Basado en un análisis combinado de grandes estudios mundiales de casos-contrroles, se hizo una clasificación epidemiológica de los tipos de hrHPV, lo que indica que 15 tipos de HPV (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) se pueden clasificar como de alto riesgo y otros 3 (HPV 26, 53 y 66) como, probablemente, de alto riesgo (Munoz y otros, 2003, N. Eng. J. Med. 348:518-527). Los hrHPV se han detectado en hasta 99.7% de los carcinomas cervicales de células escamosas (SCCs) (Walboomers y otros, 1999, J. Pathol. 189:12-19) y al menos 94% de los carcinomas adeno-cervicales y adenoescamosos (Zielinsky y otros, 2003, J. Pathol. 201:535-543).

20 El cáncer cervicouterino representa casi el 10% de todos los cánceres femeninos y es la principal causa de cáncer entre las mujeres de los países en desarrollo (Franco, E. L. y otros, 2001, Can Med Assoc J 164: 1017-25). Las regiones con mayor incidencia de la enfermedad son generalmente las que tienen mayor mortalidad e incluyen América Central, África y el Caribe (Ferlay, J. y otros, 1998. IARC CancerBase núm. 3. Lyon:IARC Press.). La incidencia en Europa y América del Norte ha disminuido notablemente en los últimos 50 años, posiblemente debido al advenimiento de la detección rutinaria mediante la citología de Papanicolaou (Pap) (revisado en Franco y otros, *ibid*). El cáncer cervical es uno de los cánceres más prevenibles, con una supervivencia que está directamente relacionada con la etapa de la enfermedad al momento del diagnóstico. La tasa de supervivencia de 5 años es del 88% para las mujeres que tienen el diagnóstico inicial de la enfermedad localizada en comparación con el 13% de las mujeres diagnosticadas con enfermedad lejana (Informe del Grupo Revisor del Progreso de Cánceres Ginecológicos, noviembre de 2001, del Instituto Nacional del Cáncer). Más del 50% de las mujeres diagnosticadas con cáncer cervical en EE.UU. no han tenido una citología de Papanicolaou en los últimos tres años (Wright, T. C. y otros, 2000, JAMA 283: 81-6).

35 El tamizaje de Pap continúa siendo el modo predominante de detectar las lesiones cervicales precancerosas y cancerosas; más de 50 millones de mujeres en los EE.UU. se someten cada año al tamizaje de Pap (Wright, T. C. y otros, 2002, JAMA 287: 2120-29). A pesar de su uso generalizado, la citología de Pap es sólo parcialmente eficaz y muestra un grado sustancial de resultados tanto falsos negativos como falsos positivos de la prueba; basado en algunas estimaciones de la sensibilidad de la citología de Pap convencional varía de 50-60% (Lorincz, A. T. y Richart, R. M., 2003, Arch Pathol Lab Med 127: 959-68; Nanda, K. y otros, 2000. Ann Intern Med 132:810. ; Fahey MT, y otros 1995, Am J Epidemiol.141: 680-9; Myers ER, McCrory DC, Subramanian S, y otros 2000, Obstet Gynecol 96: 645-52.) a 70-80% (Clavel, C. y otros, 2001. Br J Cancer 84: 1616). Las innovaciones recientes en el tamizaje y muestreo citológico, tales como las pruebas de base líquida, han mejorado la sensibilidad de estos métodos a 75-95% (Lorincz, A. T. y otros *ibid*; Nanda, K. y otros, *ibid*. ; Hutchinson ML, Zahniser DJ, Sherman ME, y otros 1999 Cancer.87: 48-55). Sin embargo, incluso estos métodos mejorados no pueden detectar una porción importante de células anormales, y, frecuentemente precancerosas. Adicionalmente, probar la presencia de ADN de hrHPV en la prueba de Pap es probable que mejore la eficacia de los programas de tamizaje cervical particularmente, debido a su alto valor predictivo negativo para el carcinoma cervical y la lesión precursora más cercana (es decir, lesiones \geq NIC3). Además, algunas autoridades están pidiendo usar el tamizaje de ADN en conjunto con, o en algunos casos, en lugar de, los métodos citológicos convencionales (Wright, T. C. y Schiffman, M., 2003, N. Engl. J. Med. 348:489-90).

50 Las pruebas de HPV que se encuentran actualmente más ampliamente aplicadas se basan en dos principios. El primero, como se usa en el ensayo de captura híbrida 2 (hc2) aprobado por la FDA, implica la hibridación del ADN objetivo de HPV con un cóctel de ARNs de HPV tipo-específicos de longitud completa, seguido por la captura de los híbridos de ADN/ARN en una fase sólida. Posteriormente, la amplificación de la señal se logra mediante la unión de los híbridos a múltiples anticuerpos conjugados que reconocen específicamente a los híbridos de ADN/ARN. El segundo principio consiste en la amplificación por PCR de ADN objetivo HPV dirigido mediante los iniciadores consenso o generales que se unen a regiones altamente conservadas dentro de los marcos de lectura abierta E1 o L1 de todos los genotipos hrHPV genitales relevantes. Varios sistemas de lectura se han descrito para los últimos ensayos, pero los inmunoensayos enzimáticos (por ejemplo, EIA, DEIA) usando oligosondas tipo específicas (ya sean individualmente o en un cóctel (Jacobs y otros, 1997, J Clin Microbiol 35:791-795; Kleter y otros, 1998, Am J Pathol: 153:1731-1739) o ensayos de transferencia reversa en línea (por ejemplo, LiPA, RLB (van den Brule y otros, 2002, J Clin Microbiol 40:779-787; Kleter y otros, 1999, J Clin Microbiol; 37:2508-2517; Gravitt y otros, 1998, J Clin Microbiol 36:3020-3027) son más comúnmente usados en la actualidad. Entre los sistemas de PCR consenso de HPV, el PCR de PGMV basado en L1 (rediseñado de iniciadores de PCR MY11/09 (Gravitt y otros, 2000, J Clin Microbiol 38:357-361), PCR GP5+/6+ (van den Brule y otros, 2002, J Clin Microbiol 40:779-787) y SPF10-LiPA (Kleter y otros, 1999, J Clin Microbiol 37:2508-2517) son

más comúnmente aplicados en la actualidad. Más recientemente, un nuevo sistema de PCR consenso basado en L1, la prueba de HPV Roche AMPLICOR®, se puso en marcha que es capaz de detectar 13 tipos de hrHPV.

El documento US 2006/1121516 A1 describe métodos para detectar las secuencias de ácidos nucleicos en múltiples tipos de HPV que pueden estar presentes en una muestra biológica, que comprende poner en contacto el ácido nucleico en una muestra biológica que contiene ARN de al menos uno de los tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 con una mezcla de oligómeros de amplificación que amplifican una secuencia de HPV en una secuencia de la región objetivo E6/E7.

Todos los sistemas de pruebas de hrHPV actualmente disponibles tienen algunas desventajas intrínsecas que no son fácilmente resueltas mediante la adaptación de las condiciones de ensayo o de lectura. Particularmente, en el caso de que la prueba de hrHPV se pensara como una herramienta de tamizaje primario, como reflejo de la citología que se aplica en los casos hrHPV positivos, los inconvenientes de las pruebas pueden tener consecuencias negativas importantes tanto para los valores predictivos positivos o negativos de lesiones cervicales premalignas de alto grado y cáncer cervical. Esto es particularmente relevante en el caso de material vaginal de auto-muestreo que puede usarse para fines de tamizaje. Este material no es adecuado para una evaluación citológica confiable, pero es muy representativo para el estado de hrHPV del cuello uterino.

A. El método hc2 muestra un cierto grado de reactividad cruzada con tipos de HPV, incluyendo los tipos de HPV de bajo riesgo, que no están representados en la mezcla de sondas (Castle y otros, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002: 11: 1394-1399). Esto tiene un impacto negativo sobre la especificidad de este ensayo para la evaluación del riesgo de cáncer cervical.

B. Por otro lado, los diversos sistemas basados en PCR muestran diferentes sensibilidades analíticas para hrHPVs, que en la práctica dan lugar a diferentes especificidades para las lesiones cervicales premalignas de alto grado y el cáncer cervical. Lo último se debe al hecho de que muchas infecciones hrHPV, particularmente aquellas con una carga viral baja, reflejan infecciones transitorias que son clínicamente irrelevantes, mientras que las infecciones asociadas con la enfermedad cervical de alto grado se caracterizan generalmente por un aumento de la carga viral (Snijders y otros, *J Pathol.* 2003: 201:1-6; van Duin y otros, *Int J Cancer* 2002: 98: 590-595; Schlecht y otros *Int J cancer* 2003: 103 519-524.). Por lo tanto, la sensibilidad de ensayo analítico (es decir, la sensibilidad para detectar hrHPV) no es un requisito suficiente para el uso en la práctica clínica y de tamizaje. Los exámenes que son demasiado sensibles para detectar hrHPV sufren de una especificidad reducida para la enfermedad cervical de alto grado debido a un aumento en la detección de infecciones hrHPV transitorias que se caracterizan por una baja carga viral. Como consecuencia, mientras que la mayoría de los ensayos consenso de ADN de hrHPV muestran sensibilidades similares para las lesiones cervicales premalignas de alto grado y cáncer cervical, los valores de especificidad pueden variar notablemente. En la actualidad, el PCR GP5+/6+ y los ensayos de HC2 son las dos únicas pruebas que muestran un equilibrio óptimo entre sensibilidad y especificidad para las lesiones cervicales premalignas de alto grado y el carcinoma de cuello de útero y por lo tanto puede considerarse clínicamente validados (Lorincz y Richart, *Arch Pathol Lab Med* 2003: 127:959-968; Bulk y otros *Int J Cancer* 2007: 121: 361-367) Estos ensayos tienen una sensibilidad y especificidad similar cuando se usa para la detección de lesiones \geq NIC2 (Hesselink y otros *J Clin Microbiol* 2006: 44: 3680-3685).

C. Particularmente, en las lesiones cervicales premalignas de alto grado y carcinomas de cuello uterino el genoma de hrHPV frecuentemente se integra en el genoma de la célula huésped. Dado que este fenómeno frecuentemente se acompaña de una interrupción del genoma viral en una región que se puede extender desde el marco de lectura abierto E1 hasta L1, esto puede tener consecuencias para la amplificación mediada por PCR del ADN viral en estas regiones. Claramente, hay indicaciones de que la integración impide la detección del ADN viral por E1 y/o ensayos de PCR basado en L1 en aproximadamente 4% de los SCC cervicales (Walboomers y otros, 1999, *J Pathol* 189: 12-19), 5% de todos los HSIL, 6% de las lesiones de adenocarcinoma cervical *in situ*, y 10% de adenocarcinomas cervicales (Zielinski y otros, 2003, *J Pathol* 201:535-543). Estas clasificaciones de falsos negativos de los métodos de PCR basados en L1 y E1 para los carcinomas cervicales y lesiones precursoras de alto grado son inaceptables en el caso de se pensara en las pruebas de hrHPV como una herramienta de tamizaje primario, como reflejo de la citología que se aplica en los casos hrHPV positivos.

Por lo tanto, todavía hay necesidad de un sistema de detección mejorada de hrHPV.

Breve descripción de la invención

Para superar estas dificultades, los inventores encontraron ahora un método para la detección simultánea de 14 tipos de hrHPV (es decir, el HPV tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) y un candidato tipo hrHPV (HPV 67), que muestra una especificidad similar para las lesiones cervicales de alto grado como el PCR GP5+/6+, pero que no está influenciada por la integración del ADN viral. Además, y en un aspecto adicional de la invención, los inventores encontraron un método para un sistema de tipificación eficiente para los tipos de HPV pertenecientes a los tipos de hrHPV anteriormente mencionados, que es compatible con el método de detección.

Un método para la detección de los hrHPV acuerdo con la presente invención comprende las etapas de proporcionar una muestra sospechosa de contener los hrHPV, proporcionar una pluralidad de iniciadores directos e inversos en conjunto, sustancialmente complementarios al ADN de dichos hrHPV, realizar una reacción para amplificar el ADN derivado de dicha muestra utilizando dicha pluralidad de iniciadores; y detectar los productos de amplificación de ADN de los tipos hrHPV por hibridación de los productos de la reacción de dicha reacción de amplificación de ADN con una pluralidad de sondas específicas de hrHPV.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para la tipificación de un hrHPV que comprende las etapas de proporcionar los productos de amplificación de ADN mediante la amplificación de ADN de hrHPV usando una pluralidad de iniciadores directos e inversos y detectar los productos de amplificación de ADN de uno o más tipos de hrHPV por hibridación de dichos productos de amplificación con al menos una sonda de hrHPV específica que es sustancialmente complementaria al ADN de al menos uno pero no todos los tipos de hrHPV.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un conjunto de iniciadores de amplificación directos e inversos para la amplificación del ADN-hrHPV.

En aún otro aspecto, la invención proporciona sondas de oligonucleótidos tipo específicas para la detección de específica de tipo o selectiva de tipos individuales de hrHPV.

20 Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un conjunto de iniciadores directo e inversos usados en la amplificación por PCR de HRE7 de hrHPV.
 La Figura 2 muestra las secuencias de sondas de EIA para la detección de los productos del PCR de HRE7.
 La Figura 3 muestra las secuencias de las sondas RLB para la tipificación de los productos del PCR de HRE7.

Descripción detallada de la invención

Un "complemento" o "secuencia complementaria" es una secuencia de nucleótidos que forma un dúplex con enlaces de hidrógeno con otra secuencia de nucleótidos de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick. Por ejemplo, la secuencia de bases complementaria para 5'-AAGGCT-3' es 3'-TTCCGA-5'.

"Expresión" se refiere a la transcripción de un gen en el ARN estructural (ARNr, ARNt) o ARN mensajero (ARNm) y, si se aplica, la traducción posterior en una proteína.

Los polinucleótidos son "heterólogos" entre sí si no se originan de forma natural en un mismo organismo. Un polinucleótido es heterólogo a un organismo, si no se origina naturalmente en su forma y disposición particular en ese organismo.

Los polinucleótidos tienen secuencias "homólogas" si la secuencia de nucleótidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para correspondencia máxima como se describe en la presente invención. La comparación de secuencias entre dos o más polinucleótidos se realiza generalmente mediante la comparación de las porciones de las dos secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. La ventana de comparación es generalmente de aproximadamente 20 a 200 nucleótidos contiguos. El "porcentaje de homología de secuencia" para los polinucleótidos, tal como , 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 o 100 por ciento de homología de secuencia se puede determinar por comparación de dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en donde la parte de la secuencia del polipéptido en la ventana de comparación puede incluir adiciones o deleciones (es decir, interrupciones) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de dos secuencias. El porcentaje se calcula para: (a) determinar el número de posiciones coincidentes; (b) dividir el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación; y (c) multiplicar el resultado por 100 para obtener el porcentaje de homología de secuencia. La alineación óptima de las secuencias para comparación se puede llevar a cabo mediante implementaciones computarizadas de algoritmos conocidos, o por inspección. Comparaciones de secuencias y algoritmos de alineación de múltiples secuencias fácilmente disponibles son, respectivamente, los programas de herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) (Altschul y otros, J. Mol. Biol. 1990. J. Mol. Biol. 215:403; Altschul, S.F. y otros 1997. Nucleic Acid Res. 25:3389-3402) y ClustalW ambos disponibles en internet. Otros programas adecuados incluyen GAP, BESTFIT y FASTA en el Paquete de Programas para Genética de Wisconsin (Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI, EE.UU.).

Como se usa en la presente descripción, "complementario" o "sustancialmente complementario" significa que dos secuencias de ácido nucleicos tienen al menos aproximadamente 90%, preferentemente aproximadamente 93%, con mayor preferencia 95%, y con la máxima preferencia aproximadamente 98%, de complementariedad de secuencias entre sí. Esto significa que los iniciadores y sondas deben exhibir suficiente complementariedad con su molde y con su ácido nucleico objetivo, respectivamente, para hibridarse en condiciones rigurosas. Por lo tanto, las secuencias del iniciador como se describe en esta especificación no necesitan reflejar la secuencia complementaria exacta de la región

de unión en el molde y se pueden usar iniciadores degenerados. Una secuencia del iniciador sustancialmente complementaria es una que tiene suficiente complementariedad de secuencia con el molde de amplificación para dar lugar a la unión del iniciador y la síntesis de la segunda cadena.

5 El término "híbrido" se refiere a una molécula de ácido nucleico de doble cadena, o dúplex, formada por enlaces de hidrógeno entre los nucleótidos complementarios. Los términos "hibridar" o "hibridación" se refieren al proceso por el cual las cadenas sencillas de secuencias de ácidos nucleicos forman segmentos de doble hélice mediante enlaces de hidrógeno entre los nucleótidos complementarios.

10 El término "oligonucleótido" se refiere a una secuencia corta de monómeros de nucleótidos (generalmente de 6 a 100 nucleótidos) unidos por enlaces de fósforo (por ejemplo, fosfodiéster, alquil y arilfosfato, fosfortioato), o enlaces de no-fósforo (por ejemplo, péptido, sulfamato y otros). Un oligonucleótido puede contener nucleótidos modificados que tienen bases modificadas (por ejemplo, 5-metil citosina) y grupos azúcar modificados (por ejemplo, 2'-O-metil ribosilo, 2'-O-metoxietil ribosilo, 2'-fluoro ribosilo, 2'-amino ribosilo, y similares). Los oligonucleótidos pueden ser de origen natural o moléculas sintéticas de ADN de doble y simple cadena y ARN de doble y simple cadena con formas circulares, ramificadas o lineales e incluyen opcionalmente dominios capaces de formar estructuras secundarias estables (por ejemplo, estructuras de tallo y lazo y las de lazo-tallo-lazo).

20 El término "iniciador" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridarse con el objetivo de amplificación lo que permite a una ADN polimerasa adherirse, sirviendo de esta manera como un punto de iniciación de la síntesis de ADN cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis del producto de extensión del iniciador que es complementario a una cadena de ácido nucleico, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización tal como la ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados. El iniciador (de la amplificación) es preferentemente de cadena simple para una máxima eficiencia en la amplificación. Preferentemente, el iniciador es un ribonucleótido oligodexosi. Un iniciador debe ser suficientemente largo para iniciar la síntesis de los productos de extensión en presencia del agente para la polimerización. Las longitudes exactas de los iniciadores dependerán de muchos factores, incluyendo la temperatura y la fuente del iniciador. Un "par de iniciadores bidireccionales" como se utiliza en la presente descripción consiste en un iniciador directo y uno inverso tal como se utiliza comúnmente en la técnica de la amplificación de ADN tal como en la amplificación por PCR.

30 El término "sonda" se refiere a una secuencia de oligonucleótido de cadena simple que reconocerá y formará un dúplex con enlaces de hidrógeno con una secuencia complementaria en un analito de secuencia de ácido nucleico objetivo o su derivado de ADNc.

35 El término "condiciones rigurosas" o "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a las condiciones de hibridación que afectan la estabilidad de los híbridos, por ejemplo, temperatura, concentración de sal, pH, concentración de formamida y similares. Estas condiciones se optimizan empíricamente para maximizar la unión específica y minimizar la unión no específica del iniciador o sonda con su secuencia de ácido nucleico objetivo. El término tal como se usa incluye la referencia a las condiciones bajo las cuales una sonda o iniciador se hibridará con su secuencia objetivo, en un grado detectablemente mayor que con otras secuencias (por ejemplo al menos 2 veces respecto a los valores iniciales). Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser aproximadamente 5°C más baja que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de una secuencia objetivo complementaria hibrida con una sonda o iniciador perfectamente coincidente. Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor que aproximadamente 1,0 M del ión Na^+ , típicamente de aproximadamente 0,01 a la concentración de 1,0 M de ión Na^+ (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para sondas o iniciadores cortos (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60°C para sondas o iniciadores largos (por ejemplo, mayor que 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas pueden lograrse además con la adición de agentes desestabilizantes tales como la formamida. Las condiciones rigurosas bajas ilustrativas o "condiciones de rigurosidad reducida" incluyen hibridación con una solución tampón de 30% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS a 37°C y un lavado en 2x SSC a 40°C. Las condiciones de rigurosidad alta ilustrativas incluyen la hibridación en formamida al 50%, 1 M de NaCl, 1% de SDS a 37°C, y un lavado en 0,1x SSC a 60°C. Los procedimientos de hibridación son bien conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc., 1994.

Un método de la presente invención permite la detección, identificación y diagnóstico del virus del papiloma humano que pertenecen al subgrupo de virus del papiloma humano de alto riesgo (hrHPV) en cánceres cervical y otros anogenitales que son causados por hrHPV.

60 Detección de hrHPV

Un método para la detección de 14 tipos de hrHPV (es decir, el HPV tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) y un candidato hrHPV tipo (HPV 67) (en lo adelante se indica como los hrHPV) de acuerdo con la presente invención se puede realizar en muestras clínicas humanas. Preferentemente, una muestra para uso en un método de la invención comprende una muestra de citología cervical de una mujer para evaluar el riesgo de cáncer cervical.

Los métodos para obtener y preparar tales muestras para uso en el método de la invención se conocen por los expertos en la técnica, o serán evidentes a partir de la presente descripción. Para los métodos generales que contienen el análisis de ADN y las manipulaciones ver, por ejemplo *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2da edición, Vol. 1-3, eds. Sambrook y otros Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) o *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel y otros, Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York (1987) y actualizaciones periódicas de los mismos.

Preferentemente, un método de acuerdo con la invención se usa para la detección de 14 tipos de hrHPV (es decir, HPV tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) y un candidato tipo hrHPV (HPV 67).

Es un aspecto ventajoso de la invención que los miembros del subgrupo de los hrHPV que aún no se probaron o descubrieron pueden detectarse adecuadamente mediante el uso de un método de la presente invención.

En el método para la detección de los hrHPV de la presente invención se describe un método basado en el PCR consenso usando conjuntos de 6 iniciadores directos y 9 iniciadores inversos, algunos de los cuales se solapan, que juntos amplifican un fragmento de aproximadamente 215 a 245 pares de bases del marco de lectura abierto E7, dependiente del tipo de HPV.

El oncogén viral E7 es importante tanto para la iniciación como para el mantenimiento del fenotipo transformado mediado por hrHPV. Objetivamente esto significa que el marco de lectura abierto E7 siempre se mantiene en el cáncer cervical y sus etapas precursoras (Zur Hausen, *arriba*). Además, sorprendentemente parece que la región E7 es suficientemente heterogénea entre los diferentes tipos de HPV para seleccionar combinaciones de iniciadores y sondas que no reaccionan de forma cruzada con otros tipos de HPV.

Los iniciadores directos e inversos mencionados anteriormente coinciden con las regiones en o entre las posiciones de los nucleótidos 622-644 y 828-847, respectivamente, del genoma del HPV tipo 16 (número de acceso GenBank NC 001526) y posiciones equivalentes dentro del genoma de otros genotipos del hrHPV. Los iniciadores de mejor coincidencia en el cóctel tienen como máximo dos desajustes con las secuencias objetivo de los respectivos tipos de HPV.

Basándose en este descubrimiento, la presente invención se proporciona un conjunto de iniciadores directos e inversos en donde cada iniciador individual es capaz de hibridar a la región E7 de uno o más tipos de hrHPV. El conjunto completo de 6 iniciadores directos y 9 inversos proporcionan una pluralidad de iniciadores que, cuando se usa en conjunto, son capaces de hibridar con el ADN de E7 de cualquiera de los hrHPVs mencionados y para amplificar las secuencias de ADN definidas entre y adyacentes a las posiciones 622- 644 y 828-847 del HPV 16 y posiciones equivalentes dentro del genoma de otros tipos de hrHPV.

La resistencia del conjunto de iniciadores es su amplia especificidad con respecto a los tipos de hrHPV mientras que mantienen una sensibilidad óptima. La sensibilidad es óptima debido a que es lo suficientemente alta para ser capaz de detectar infecciones hrHPV reales, mientras que es lo suficientemente baja como para no desencadenarse por una carga viral muy baja, lo que es característico en cantidades transitorias y clínicamente irrelevantes de hrHPV en la muestra. Esta notable combinación se logra mediante la selección de iniciadores que en la mayoría de los casos no son 100% complementarios con las secuencias virales objetivo, sino que contienen uno o dos desajustes. Los conjuntos de iniciadores de la técnica anterior, por ejemplo, los conjuntos de iniciadores como se describen en el documento de la patente WO 03/020976, tienen una alta sensibilidad analítica hrHPV y, en consecuencia, tienen una menor especificidad para las lesiones NIC2 o NIC3 (Snijders, P. y otros, 2003, *J. Pathol.* 201:1-6).

El conjunto de iniciadores directos e inversos para amplificar dicha región se presenta en la Figura 1. Es posible usar iniciadores algo más cortos o algo más largos. En el presente conjunto de iniciadores de la Figura 1 los iniciadores inversos son intencionalmente más cortos que los iniciadores directos para igualar la Tm de las mezclas de iniciadores.

En principio, los métodos de la invención pueden realizarse usando cualquier método de amplificación de ácido nucleico, tal como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR; Mullis 1987, Patente de los EE.UU. núm. 4,683,195, 4,683,202, en4,800,159) o usando reacciones de amplificación tales como Reacción en Cadena de Ligasa (LCR; Barany 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193; Solicitud de Patente Europea núm. 320,308), Replicación de secuencia autosostenida (3SR; Guatelli y otros, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), Amplificación por Desplazamiento de la Cadena (SDA; Patente de los EE. UU. núms. 5,270,184, en5,455,166), Sistema de Amplificación de la Transcripción (TAS; Kwoh y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicasa (Lizardi y otros, 1988, *Bio/Technology* 6:1197), Amplificación por Círculo Rodante (RCA; Patente de los EE. UU. núm. 5,871,921), Amplificación basada en la Secuencia de Ácido Nucleico (NASBA), Polimorfismo de Longitud del Fragmento de corte (Patente de los EE. UU. núm. 5,719,028), Amplificación de Ácido Nucleico isotérmica e iniciada con iniciador químico (ICAN), Método de amplificación ramificación-extensión (RAM; Patente de los EE. UU. núms. 5,719,028 y 5,942,391) u otros métodos adecuados para la amplificación de ADN.

Una modalidad preferida de acuerdo con la presente invención usa un método de PCR que comprende la amplificación

iniciada con el iniciador del ADN de hrHPV con el conjunto de 6 iniciadores directos y 9 inversos (o invertidos) de la Figura 1.

5 Para amplificar el ADN de los tipos de HPV con un pequeño número de desajustes con uno o más de los iniciadores de amplificación, puede realizarse una reacción de amplificación bajo condiciones de rigurosidad reducida (por ejemplo, una amplificación por PCR usando una temperatura de hibridación de bajo a 38°C, o la presencia de hasta 3.5 mM de MgCl₂). El experto en la técnica será capaz de seleccionar las condiciones de rigurosidad adecuadas.

10 La detección de los productos de amplificación puede, en principio, llevarse a cabo mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los fragmentos de detección pueden teñirse o marcarse directamente con marcadores radiactivos, anticuerpos, colorantes luminiscentes, colorantes fluorescentes, o reactivos enzimáticos. Los tintes de ADN directos incluyen, por ejemplo colorantes intercalantes tales como naranja de acridina, bromuro de etidio, monoazida de etidio o colorantes Hoechst. Preferentemente un formato EIA puede usarse con la ayuda de un cóctel de oligosondas de tipo específicas como se ejemplifica en la Figura 2. En otra modalidad preferida la detección tiene lugar
15 mediante hibridación con oligosondas inmovilizadas de tipo específicas (Figura 3).

Alternativamente, los fragmentos de ADN pueden detectarse mediante la incorporación de bases dNTP marcadas en los fragmentos de ADN sintetizados. Los marcadores de detección que pueden asociarse con bases de nucleótidos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, colorante de cianina o BrdUrd.

20 La presente invención implica preferentemente la detección de los productos de reacción obtenidos mediante la reacción de amplificación de ADN descrita anteriormente en el ADN de hrHPV al hibridar los productos de reacción con una o más sondas específicas de hrHPV.

25 Cuando se usa un sistema de detección basado en sondas, un procedimiento de detección adecuado para su uso en la presente invención puede comprender, por ejemplo, un formato de inmunoensayo enzimático (EIA) (Jacobs y otros, 1997, J. Clin. Microbiol. 35, 791-795). Para realizar una detección a manera de procedimiento de EIA, ya sea con el iniciador directo o inverso usado en la reacción de amplificación puede comprender un grupo de captura, tal como un grupo de biotina para la inmovilización de los amplicones de PCR de ADN de hrHPV en, por ejemplo, unos pocillos de placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina para su posterior detección EIA de amplicones hrHPV (ver más
30 abajo). El experto comprenderá que se pueden emplear otros grupos para la inmovilización de los amplicones de PCR de ADN de hrHPV en un formato EIA.

35 Tipificación de los hrHPV

Parece, además, que la región E7 es suficientemente heterogénea entre los diferentes tipos de HPV para seleccionar combinaciones de iniciadores y sondas que no reaccionan de forma cruzada con otros tipos de HPV.

40 Por lo tanto, y en otro aspecto de la invención, los diversos tipos de HPV que pertenecen a los tipos de hrHPV como se indica anteriormente pueden detectarse mediante el uso de una pluralidad de sondas de detección de hrHPV de tipo específicas que, de forma individual, se unen sólo con el amplicón de un tipo de HPV de alto riesgo específico. Así, mediante la amplificación de la región de secuencia de ADN entre las dos regiones de consenso como se define en la presente descripción, seguido por el sondeo de las secuencias únicas de cada tipo de HPV individual, se proporciona un método para la tipificación de los diversos HPV de alto riesgo.

45 Las sondas útiles para la detección tipo específica de la región E7 como se describe en la presente descripción se ejemplifican en la Figura 2 para la detección de EIA y en la Figura 3 para la detección mediante transferencia reversa en línea (RLB). Estas sondas tipo específicas unen preferentemente sólo al menos una parte de la región de secuencia de ADN como amplificado entre las dos regiones de consenso de un único tipo de HPV que pertenece al grupo de los hrHPV. Además las secuencias complementarias de los enumerados en la Figura 3 se pueden usar adecuadamente
50 como sondas de detección de tipo específico en un método de la invención, siempre y cuando una cadena complementaria de ese tipo se amplifica en la reacción de amplificación empleada.

55 Las sondas usadas en un método de tipificación de acuerdo con la invención se unen selectivamente con el amplicón de un cierto tipo o tipos de HPV, pero no - o sólo débilmente bajo condiciones de hibridación de astringencia muy baja - con el amplicón de otros tipos de HPV. En consecuencia, en una modalidad, la invención puede usarse para determinar el tipo o los tipos de HPV que infectan a un paciente. Esto es muy significativo, ya que la progresión a la enfermedad maligna (y por lo tanto el pronóstico clínico) depende en gran medida del tipo de HPV. En consecuencia, en un aspecto de tipificación, la invención proporciona un método para determinar el tipo (s) de infección por HPV en un paciente.

60 En una modalidad preferida de un método para la tipificación de los hrHPV de la presente invención un conjunto de 15 sondas diferentes (Figura 3), o las secuencias complementarias de estas, se usa que se hibridan con las secuencias de tipo específico en los amplicones derivables de los 15 hrHPV diferente.

65 Los procedimientos de detección adecuados para su uso en el aspecto de la tipificación de la presente invención pueden comprender, por ejemplo la inmovilización de los amplicones y sondear las secuencias de ADN de esta por

ejemplo, transferencia de Southern. Otros formatos pueden comprender un formato de EIA como se describió anteriormente (y después preferentemente se usan las sondas de la Figura 2). Para facilitar la detección de la unión, la sonda hrHPV tipo específica puede comprender una porción del marcador tal como un fluoróforo, un cromóforo, una enzima o un radio-marcador, para facilitar el monitoreo de la unión de las sondas con el producto de reacción de la reacción de amplificación. Tales marcadores son bien conocidos para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), β -galactosidasa, peroxidasa de rábano picante, estreptavidina, biotina, digoxigenina, ^{35}S o ^{125}I . Otros ejemplos serán evidentes para los expertos en la técnica.

Aunque se pueden emplear otros métodos, un método de tipificación de acuerdo con la invención se realiza preferentemente mediante hibridación de productos de PCR con sondas tipo específica inmovilizadas a perlas o filtros RLB, tales como los descritos recientemente para, por ejemplo, un método PCR de HPV consenso basado en L1 (van den Brule y otros, 2002, J. Clin. Microbiol. 40, 779-787). Para este propósito las sondas de RLB se sintetizan preferentemente con un grupo 5' amino para la posterior inmovilización en, por ejemplo, membranas de nylon recubiertas con carboxilo. La ventaja de un formato de ese tipo es la facilidad del sistema y su velocidad, permitiendo así el procesamiento de muestras de alto rendimiento.

Un método de tipificación de los hrHPV de acuerdo con la invención puede realizarse de material de muestra fresca como se describió anteriormente (sólo si tales muestras proporcionarían suficiente virus ADN). Alternativamente, la tipificación de los hrHPV de acuerdo con un método de la invención puede realizarse directamente en amplicones o productos de reacción de amplificación de ADN obtenidos usando la reacción de amplificación de ADN como se describe en la presente descripción anteriormente.

Iniciadores y sondas

En un aspecto adicional, la invención proporciona un conjunto de iniciadores de amplificación directo e inversos para la amplificación de de ADN de hrHPV para su uso en un método de la invención. Estos iniciadores son preferentemente iniciadores de oligonucleótidos con una longitud de secuencia de aproximadamente 8 a aproximadamente 35, preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30, con mayor preferencia de aproximadamente 18 a aproximadamente 25 nucleótidos. En una modalidad más preferida, el iniciador directo comprende de aproximadamente 22 a 23 nucleótidos, mientras que el iniciador inverso comprende de aproximadamente 19 a 21 nucleótidos. Preferentemente, uno de los iniciadores se marca con un grupo para facilitar la inmovilización o la tinción de una de las cadenas de los amplicones hrHPV de cadena doble.

La secuencia de nucleótidos de los iniciadores directos e inversos de la presente invención deben diseñarse para permitir la formación de un híbrido estable entre el iniciador y el ADN objetivo en la posición de una de las dos regiones de consenso en la región E7 del genoma de hrHPV como se define en la presente descripción. Por consiguiente, la secuencia de nucleótidos del iniciador directo se elige preferentemente del grupo de iniciadores directos presentados en la Figura 1. Del mismo modo, el iniciador inverso o invertido se elige preferentemente del grupo de iniciadores inversos presentados en la Figura 1. Cuando se usa en concordancia con, los iniciadores de la Figura 1 amplificarán el ADN de una región correspondiente en el genoma de todos los hrHPV como se define en la presente descripción.

Los iniciadores se seleccionaron para ser "esencialmente" complementarios a las regiones de consenso presentes en las diferentes cadenas de cada secuencia específica que se amplifica. Es posible usar iniciadores algo más cortos o algo más largos en comparación con las secuencias de los iniciadores de la Figura 1.

Los amplicones comprenden regiones caracterizadas por motivos comunes, así como secuencias únicas entre los diversos hrHPV.

En otro aspecto, la invención proporciona sondas de oligonucleótidos para la detección de tipo específica o selectiva de tipos de HPV individuales o subconjuntos de los tipos pertenecientes a los tipos de hrHPV. En una modalidad preferida se proporciona una sonda para cada tipo de HPV, siendo tales sondas por lo tanto de tipo específico. La presente invención describe dos conjuntos de 15 secuencias de sonda tipo específicas adecuadas para la detección tipo específica de los hrHPV específicos mencionados en las Figuras 2 y 3. Aunque algunos desajustes serían permisibles, se prefiere que las sondas de tipificación sean perfectamente complementarias a sus respectivas secuencias objetivos. Como se ha indicado anteriormente, las secuencias complementarias de las presentadas en las Figuras 2 y 3 pueden usarse además como sondas tipo específicas en los métodos de la presente invención, siempre y cuando la reacción de amplificación permita la amplificación de los fragmentos de ADN complementarios. Por lo tanto, cuando se refiere a las sondas de las figuras 2 y 3, se pretende que se incluyan las secuencias complementarias de estas.

Las sondas de detección tipo específica o selectiva pueden usarse en una variedad de procedimientos de tipificación. Los procedimientos adecuados comprenden aquellos con lo cual la sonda objetivo se inmoviliza, pero además pueden usarse procedimientos por los cuales se inmovilizan las sondas. Como ejemplos de esto último, pueden usarse ambos tipo de formatos biochip, formatos de perla, sino además los formatos de transferencia reversa en línea, tal como RLB o Ensayos de Sondas en Línea. Dependiendo del sustrato para la inmovilización y la química de la superficie seleccionada, el experto es capaz de elegir un grupo adecuado con el que la sonda de oligonucleótido se marca para la

inmovilización de sustrato. En una modalidad preferida este grupo es un grupo amino introducido en el extremo 5' de la sonda.

5 Las sondas de detección tipo específicas son preferentemente sondas de oligonucleótidos con una longitud de secuencia de aproximadamente 8 a aproximadamente 35, preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 nucleótidos. Para el ensayo EIA se prefieren generalmente las sondas más largas, es decir, aproximadamente 25 a aproximadamente 35 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 26 a 31 nucleótidos. Para los ensayos RLB generalmente las sondas más cortas serán suficientes, de aproximadamente 15 a aproximadamente 22 nucleótidos, con mayor preferencia de aproximadamente 18 a aproximadamente 20 nucleótidos.

10 El experto es consciente de que la temperatura de hibridación de las sondas individuales dentro de un conjunto de sondas que se usa en una reacción de hibridación puede ajustarse de forma adecuada proporcionando equilibrio entre el contenido de G+C y longitud de la sonda.

15 En una modalidad, la presente invención además proporciona un kit que comprende iniciadores y sondas para realizar un método de la invención. Una modalidad preferida de un kit de este tipo comprende tanto los iniciadores de amplificación como se describe en la Figura 1 y las sondas tipo específicas, como se describe en una o ambas de las Figuras 2 y 3.

20 Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran diversas modalidades de la presente invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Ensayos en los ADN virales puros.

25 El ensayo de PCR de HRE7 se realizó en primer lugar en diluciones seriadas de ADN de plásmido de diversos tipos de HPV que incluyen los tipos hrHPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67 y 68, y HPV 6, 11, 26, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 57, y 61 en un fondo de 100 ng de ADN de placenta humana. Las mezclas de reacción de PCR de 50 μ l contuvieron 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 20 pmol de cada iniciador, 1 unidad de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer, Foster City, CA), y 10 μ l de ADN objetivo en tampón Taq Gold (Perkin-Elmer, Foster City, CA). 40 ciclos de PCR se realizaron usando un termociclador PE 9700 (Perkin-Elmer, Foster City, CA). Cada reacción de PCR se inició mediante una etapa de precalentamiento durante 6 minutos a 94°C seguido de 40 ciclos que consisten en una etapa de desnaturalización (30 segundos a 94°C), una etapa de hibridación del iniciador (60 segundos a 60°C), y una etapa de alargamiento (60 segundos a 72°C). Los tiempos de rampa fueron como se describió previamente (van den Brule y otros, 2002, J. Clin. Microbiol. 40, 779-787). La etapa final de elongación se extendió durante 4 minutos.

35 Los 15 clones de hrHPV revelaron una señal de amplificación clara determinado por lectura de EIA, mientras que ninguna reactividad cruzada se observó con el ADN humano o de otros tipos de HPV tales como HPV 6, 11, 26, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 57, y 61. Esto indica una alta especificidad. Las líneas de dilución de los HPV clonados 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67 y 68 mezclados con ADN de placenta humana revelaron una sensibilidad analítica en el intervalo de 10 fg a 100 fg de ADN de plásmido, que corresponde a aproximadamente 200 a 2,000 copias virales por prueba. Esto contradice el rendimiento de un ensayo de PCR multiplex de hrHPV publicado dirigido a la región E7, que fue mucho más sensible mediante la detección de aproximadamente 10 copias virales por prueba (Gheit y otros, J Clin Microbiol. 2006: 44: 2025-2031). Como consecuencia, los últimos ensayos detectaron un mayor número de infecciones de hrHPV, que incluyen infecciones múltiples, que PCR GP5+/6+ (Gheit y otros, J Clin Microbiol. 2006: 44: 2025-2031). Además la tipificación RLB reveló señales específicas sin reactividad cruzada y la sensibilidad fue en el mismo intervalo que el de EIA.

Ejemplo 2: Estudio piloto sobre muestras de tejido

50 En un experimento piloto, se inició la aplicación del ensayo de PCR de HRE7 en una serie de especímenes de carcinoma cervical tanto del histotipo escamoso como adenocarcinoma que previamente se probaron mediante el PCR GP5+/6+. Estos incluyen muestras que se clasificaron como negativas mediante el PCR GP5+/6+ basadas en L1, pero como positivas mediante el PCR tipo específico E6/E7 para uno o más tipos de hrHPV (Walboomers y otros, J Pathol 1999: 189: 12-19; Zielinski y otros, J Pathol 2003: 201: 535-543). El último hallazgo es sugerente de la integración del ADN viral con la interrupción de la región L1 donde residen las secuencias de unión del iniciador GP5+ y GP6+. El ensayo de PCR de HRE7 hasta ahora no sólo confirmó la positividad obtenida mediante el PCR GP5+/6+, sino además clasificaron a 25 muestras positivas que fueron negativas por el PCR GP5+/6+, pero positivas por el PCR E6/E7 de tipo específico. Sobre la base de estos datos pilotos, se puede prever que en comparación con ensayos de PCR basados en L1 o E1, el PCR de HRE7 puede detectar al menos 5% más de los carcinomas.

60 Ejemplo 3: Análisis de los raspados cervicales en los estudios de cohorte

65 Para el análisis del rendimiento del ensayo de PCR de HRE7 en raspados cervicales, se estudiaron un número más grande de raspados cervicales recogidos durante el curso de diversos ensayos de tamizaje cervical basados en la población, tales como el ensayo POBASCAM (Bulkmans y otros, Int J Cancer 2004: 110: 94-101) trial. Los raspados cervicales incluyeron un total de 56 raspados de mujeres con \geq NIC 3 y 300 de las mujeres con citología normal repetida

participando en el ensayo POBASCAM en un intervalo de 5 años. Un análisis adicional implicó una serie de 35 raspados cervicales que fueron negativos mediante el PCR GP5+/6+ estándar realizado en extractos crudos de las mujeres con NIC 3 seleccionados de entre casi 1.500 mujeres con prevalencia/incidencia de NIC 3 en diversos cohortes. El PCR de HRE7 se realizó en ADN aislado mientras que PCR GP5+/6+ se realizó tanto en extractos crudos (método clásico PCR GP5+/6+; PCR GP5+/6+ (crudo)) como el ADN aislado (PCR GP5+/6+ (aislado)).

El PCR GP5+/6+ (crudo), PCR GP5+/6+ (aislado) y el PCR de HRE7 revelaron un resultado de la prueba positivo para los 56 (100%) raspados cervicales de las mujeres de POBASCAM con \geq NIC 3. La tasa de positividad de las muestras normales fue de 11/300 (3.7%, IC95%:1.6-5.9) para PCR GP5+/6+ (crudo) frente a 19/300 (6.3%, IC95%:3.5-9.1) para el PCR de HRE7. El PCR GP5+/6+ (aislado) clasificó un número similar de raspados normales positivos (es decir 17/300, 5.6%, IC95%:3.0-8.2) que el PCR de HRE7 ($P=0.5$). Además, el PCR de HRE7 fue positivo para 25/35 (71%, IC95%:56-86) de los raspados negativos por PCR GP5+/6+ (crudo) de mujeres con \geq NIC3. Aunque el PCR GP5+/6+ (aislado) fue positivo, así como para 14 de los 35 raspados (40%, IC95%: 24-56), esta tasa de positividad fue aún menor que la del PCR de HRE7 ($P<0,001$). Para los casos que se clasifican como positivo por el PCR de HRE7, pero negativos por el PCR GP5+/6+ se verificará la integración viral mediante el ensayo APOT (Klaes y otros, Cancer Res. 1999, 15; 59:6132-6136).

Ejemplo 4: Comparación de la genotipificación de HPV de alto riesgo mediante PCR de HRE7 y PCR GP5+/6+ usando la transferencia reversa en línea

Todos los productos de PCR de las muestras detalladas en el Ejemplo 3 que fueron positivos tanto en el PCR de HRE7 como el PCR GP5+/6+ se sometieron a genotipificación usando los métodos RLB enlazados a los dos ensayos de PCR. Para estos casos el acuerdo para la genotipificación de uno o más de los 15 tipos de hrHPV detectables por ambos ensayos fue de 100% ($Kappa = 1,0$).

Reivindicaciones

1. Método para la detección de la presencia de uno o más tipos de hrHPV, seleccionado del grupo que consiste en tipo de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67 y 68 que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar una muestra sospechosa de contener dichos hrHPV;
 - (b) proporcionar una pluralidad de iniciadores directos e inversos que comprende los iniciadores de la Figura 1,
 - (c) realizar una reacción para amplificar el ADN derivado de dicha muestra usando dicha pluralidad de iniciadores; y
 - (d) detectar los productos de amplificación de ADN de uno o más de dichos hrHPV a partir de dicha muestra

preferentemente en donde la etapa (d) se lleva a cabo mediante la hibridación de los productos de reacción de dicha reacción de amplificación de ADN con una pluralidad de sondas de hrHPV.
2. Método de conformidad con la reivindicación 1, en donde todos los iniciadores directos o todos los iniciadores inversos de dicha pluralidad de iniciadores comprenden un marcador biotina.
3. Método de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicha reacción para amplificar el ADN se realiza bajo condiciones de rigurosidad reducida.
4. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha pluralidad de sondas de hrHPV comprenden las sondas de la Figura 2, con mayor preferencia caracterizado porque dichas sondas comprenden un marcador DIG.
5. Método para la tipificación de uno o más tipos de hrHPV, seleccionado del grupo que consiste en tipo de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67 y 68 que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar productos de amplificación de ADN mediante la amplificación de ADN de la región E7 de hrHPV usando una pluralidad de iniciadores directos e inversos que comprenden los iniciadores de la Figura 1; y
 - (b) detectar productos de amplificación de ADN de uno o más de dichos tipos de hrHPV mediante la hibridación de dichos productos de amplificación con al menos una sonda de hrHPV que es esencialmente complementaria con el ADN de al menos uno, pero no todos de dichos tipos de hrHPV.
6. Método de conformidad con la reivindicación 5, en donde todos los iniciadores directos o todos los inversos de dicha pluralidad de iniciadores comprenden un marcador de biotina.
7. Método de conformidad con las reivindicaciones 5 o 6, en donde al menos dicha una sonda es esencialmente complementaria con el ADN de exactamente un tipo de hrHPV, preferentemente caracterizada porque al menos dicha una sonda se selecciona a partir de las sondas de cualquier Figura 2 o Figura 3.
8. Método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en donde la detección comprende el uso de una transferencia reversa en línea.
9. Una pluralidad de iniciadores directos e inversos que, cuando se usan en coordinación, son capaces de hibridar con una región en la región E7 de cualquiera de los hrHPV seleccionados del grupo que consiste en el tipo de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67 y 68, en donde dicha región es la región entre las posiciones de nucleótidos 622 y 847 de HPV 16 y la región correspondiente de los otros tipos de hrHPV, y en donde cada uno de dichos iniciadores es esencialmente complementario a la región E7 de un subgrupo de dichos hrHPV, que comprende todos los iniciadores directos e inversos como se indica en la Figura 1.

Figura 1. Secuencias de iniciadores de PCR de HRE7

Iniciadores directos (5' -3'):

gaccttactgttatgagcaatt
gacctatactgctatgagcaatt
gaccttgtatgtcacgagcaatt
gaccttttgtgttacgagcaatt
gctacgagcaatttgacagctc
cagaggatgaggatgaggatgaa

Inicadores Inversos (5' -3')

tgagaacagatggggcacaca
gtagaacagttggggcacacg
tgcacaggtagggcacacaat
ggggcacactattccaaatgt
gggcacacaacttgaatg
tgggacacactattcctagtg
tgcacacaacggacacacaaa
gttcgcacaacacgggcaaac
cgcagagtgggcacgttactg

Figura 2. Secuencias de las sondas de EIA para PCR de HRE7

Tipo de HPV	Secuencia de la sonda de EIA (5' -3')
16	Gcacaaccgaagcgtagagtcacacttgc
18	Aaatggtgatgattaactccatctatt
31	Cacacaaacgaagtgtagacttacactga
33	Atctggccggtccaagccttcacct
35	Tagtgtgcctcacatttacaacaggac
39	Tgtattgtgtgacgctgtggtcatc
45	Agttgtgcatgactaacctcatctgct
51	Cacttgaacacctgcaacaggagcttcaa
52	Tgcatagccgtagtgtgctatcacaac
56	Caaacttacctcacaacaaggtagctgtat
58	Cccgtccaagcctatttcacctcgt
59	Cagctcgtctagctagtagcaaaggatg
66	Caaactcacacttacaacaaggtagctgaat
67	Aagtgcactcacagatgttacacacagta
68	Tgaattgtgtgacgctgttgttcgtc

Figura 3: Secuencias de las sondas de RLB para la tipificación de productos de PCR de HRE

Tipo de HPV	Secuencia de la sonda de RLB (5' -3')
16	Gcgtagagtcacacttgc
18	Aaatggtgatgattaactcca
31	Cacaaacgaagtgtagactt
33	Ggtccaagccttcactct
35	Gtcgctcacatttaca
39	Gttgatgttggtgattaact
45	Ttgtcatgactaactccat
51	Gaacacctgcaacacgga
52	Gcgtagtgtgetatcac
56	Ttacctcacaacaaggtac
58	Cgaaccgtggtgccaca
59	Cgtctagctagtagcaaag
66	Actcacattacaccaaggt
67	Gtgcactcacagatgttac
68	Tgatgttggtggtgattaac