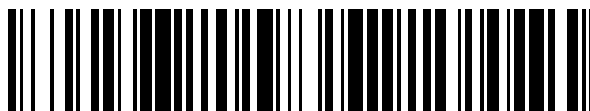


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 678**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2012 E 12829723 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 2643461**

54 Título: **Procedimientos, composiciones y kits para la determinación del virus de la Hepatitis A**

30 Prioridad:

07.09.2011 US 201161531818 P

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

18.10.2016

73 Titular/es:

**GRIFOLS THERAPEUTICS INC. (100.0%)
4101 Research Commons 79 T.W. Alexander
Drive
Research Triangle Park, NC 27709, US**

72 Inventor/es:

**BURDE, STEFAN;
BUNO, BRETT y
WRONSKA, DANUTA**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

Observaciones :

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

ES 2 586 678 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

Procedimientos, composiciones y kits para la determinación del virus de la Hepatitis A

5 **SECTOR DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere al virus de la Hepatitis A (VHA) y comprende procedimientos, composiciones y kits para la detección del mismo.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El VHA es un virus ARN que causa una infección no crónica del hígado y puede ser transmitido a través de productos de la sangre. Las donaciones de plasma recogidas para la fabricación de productos terapéuticos biológicos se someten a ensayos para la detección de ARN de VHA y las donaciones que resultan positivas son rechazadas.

La solicitud de patente internacional con número WO03/106641A2 da a conocer un procedimiento para la detección del virus de la Hepatitis A (VHA) en una muestra biológica, por ejemplo, sangre, plasma, suero y células de la sangre, basado en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, las cuales incluyen PCR, amplificación mediada por transcripción o ensayos de nucleasa 5', tal como la técnica TaqMan. Dicho procedimiento de diagnóstico está basado en la utilización de un par de cebadores con secuencias: 5'-GGATTGATTGTCAGGGCTGTC-3' y 5'-CCCTCTCACAGGATCCCATT-3'. Este procedimiento contempla diversas estrategias de amplificación y detección.

Además, la patente alemana con número DE102006034844B3 da a conocer un procedimiento para la detección del VHA y/o el Parvovirus B19 en sangre completa, plasma, suero o componentes celulares de la sangre a partir de individuos o conjuntos de hasta 96 individuos basado en el desarrollo de la técnica TaqMan. Para la detección del VHA, da a conocer la utilización de dos cebadores específicos con las secuencias: 5'-GGTAGGCTACGGGTGAAACCTCTT-3' y 5'-GTCAGTCCTCCGGCGTTGAATGG-3'; y dos sondas específicas con las secuencias: 5'-TATGAAGAGATGCCCTTGGATAGGGT-3' y 5'-TATGAAGAGATGCTTTGGATAGGGT-3'. Dichas sondas tienen el mismo colorante en 5' y en 3' el mismo colorante o colorante de extinción. Además, dicho documento da a conocer la utilización de un control interno para verificar que la PCR se ha llevado a cabo de forma correcta. Dicho control interno se añade, preferentemente, al tampón de lisis.

Por lo tanto, aún existe la necesidad de disponer de composiciones y procedimientos alternativos para la detección del VHA.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

A continuación, se da a conocer, en un aspecto, una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos, o un complemento de la misma, tal como se indica en:

5'-GCG CCC GGC GGG GTC AAC TCC AT- 3'	(SEQ ID NO: 1);
5'-AGC CAA GTT AAC ACT GCA AGG-3'	(SEQ ID NO: 2); o
5'-TTA GCA TGG AGC TGT AGG AGT CTA AAT TGG GG-3'	(SEQ ID NO: 3).

En otro aspecto, la presente invención da a conocer una composición que comprende un par de cebadores de oligonucleótidos, que comprende un cebador directo que tiene una secuencia, tal como se indica en la SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso que tiene una secuencia, tal como se indica en la SEQ ID NO: 2, en la que el par de cebadores es capaz de hibridarse a una secuencia diana en condiciones de PCR para amplificar la secuencia diana.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para la amplificación de una secuencia diana, comprendiendo el procedimiento:

llevar a cabo una PCR con la secuencia diana como plantilla, en la que la realización comprende proporcionar a la PCR un cebador directo que comprende la secuencia, tal como se indica en la SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso que comprende la secuencia, tal como se indica en la SEQ ID NO: 2.

En un aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para la determinación del VHA en una muestra, comprendiendo el procedimiento:

llevar a cabo una PCR con un plantilla de ácido nucleico en la muestra utilizando un cebador directo que comprende la secuencia, tal como se indica en la SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso que comprende la secuencia, tal como se indica en la SEQ ID NO: 2; y

detectar un amplicón generado por el cebador directo y el inverso, en el que la presencia del amplicón determina el VHA en la muestra.

Aún en otros aspectos adicionales, la presente invención da a conocer un kit que comprende las composiciones y/o una o más de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA

A continuación, se presenta, en un aspecto, una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos, tal como se indica en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, o un complemento de las mismas.

También se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos, tal como se indica en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, o un fragmento de las mismas que tiene, como mínimo, 10 nucleótidos, de manera ilustrativa, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, o 32 nucleótidos.

En otras realizaciones, las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención tienen una longitud de no más de aproximadamente 100 pares de bases, de manera ilustrativa, no más de aproximadamente: 100, 90, 80, 70, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, y 10 pares de bases.

En otra realización, la presente invención da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, o un complemento de las mismas.

La expresión "molécula de ácido nucleico" en el presente documento se refiere a polímeros compuestos de bases de nucleótidos de origen natural, azúcares y enlaces (cadena principal) internucleosídicos covalentes, así como moléculas de ácido nucleico que tienen partes de origen no natural que tienen una función similar. Además, la expresión "molécula de ácido nucleico" también se refiere a polímeros de doble cadena, de cadena única, que comprenden ARN, ADN, ARN o ADN modificado, miméticos de ARN o ADN, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, los cebadores y sondas de oligonucleótidos se pueden derivar de las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento. En varias realizaciones, los cebadores y sondas se utilizan en combinación entre sí. La presente invención se utiliza en una variedad de aplicaciones diferentes, que incluyen, sin constituir limitación, aplicaciones de investigación, médicas y de diagnóstico del VHA. Por ejemplo, los cebadores y sondas se pueden proporcionar como reactivos para su utilización, por ejemplo, en un ensayo y/o kit de detección del VHA.

Generalmente, un par de cebadores que comprende un cebador directo y un cebador inverso pueden proporcionar la amplificación específica (por ejemplo, mediante PCR) de un ácido nucleico diana flanqueado por los cebadores para producir un producto de amplificación (también referido como "amplicón"). En este sentido, cada cebador se une a su secuencia diana complementaria o sustancialmente complementaria proporcionando de este modo un sitio para que una polimerasa se una y extienda el extremo 3' de cada cebador mediante la adición de nucleótidos, proporcionando de este modo una copia complementaria de la secuencia diana.

En una realización, un par de cebadores comprende un cebador directo que tiene la secuencia, tal como se indica en la SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso que tiene la secuencia, tal como se indica en la SEQ ID NO: 2.

En una realización, el ácido nucleico diana, como mínimo, es un segmento de un ADNc preparado a partir del ARN transcrito en el sentido inverso de un VHA. Un experto en la materia reconocerá que el ARN puede ser transcrito de forma inversa utilizando procedimientos (por ejemplo, transcripción inversa (RT)) conocidos en la técnica para proporcionar una plantilla para la amplificación por los cebadores.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, se lleva a cabo una PCR con transcripción inversa (RT-PCR) utilizando una transcriptasa inversa, una polimerasa, y un par de cebadores específicos del VHA de la presente invención para amplificar ARN viral del VHA en una muestra. La muestra puede ser un sobrenadante de cultivo o una muestra de plasma preparada a partir de un individuo infectado por VHA. El par de cebadores específicos del VHA de la presente invención es capaz de amplificar ARN viral del VHA.

Generalmente, una sonda es un oligonucleótido que es complementario o sustancialmente complementario a una secuencia de nucleótidos del ácido nucleico diana. Las sondas son útiles para una variedad de aplicaciones, incluyendo, sin constituir limitación, la detección o captura del ácido nucleico diana o un amplicón correspondiente a la diana. Por ejemplo, se pueden diseñar sondas adecuadas para su utilización en procedimientos de detección basados en la amplificación a partir de cualquier secuencia situada dentro de la secuencia de un producto de amplificación y/o que comprende dicha secuencia, que sería producido utilizando dos cebadores seleccionados.

En una realización, la sonda comprende una secuencia de nucleótidos complementaria o sustancialmente

complementaria, como mínimo, a una parte de una secuencia de un amplicón generado por un par de cebadores que comprende un cebador directo que tiene la secuencia, tal como se indica en la SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso que tiene la secuencia, tal como se indica en la SEQ ID NO: 2.

- 5 En otras realizaciones, la sonda comprende la secuencia de nucleótidos, tal como se indica en la SEQ ID NO: 3, o un complemento de la misma.

Un experto en la materia reconocerá que las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención, incluyendo cebadores y/o sondas, se pueden obtener mediante técnicas estándar de biología molecular descritas en
 10 *Current Protocols in Molecular Biology* (1999. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, editores. John Wiley & Sons, Inc.) o por síntesis química o por análogos de ácidos nucleicos. Los procedimientos que implican síntesis química pueden ser automatizados y disponibles comercialmente y pueden incluir, por ejemplo, procedimientos de fosfodiéster, fosfotriéster o fosforamidita. Las patentes de EE.UU. Nos. 4.458.066; 4.415.732; y Meth. Enzymol. 1979 68:90 y 109, dan a conocer ejemplos de procedimientos de síntesis
 15 química. La síntesis química de ácidos nucleicos permite la incorporación de bases no naturales o modificadas, así como una variedad de restos de marcaje, en una molécula de ácido nucleico. Además, productos químicos con la cadena principal modificada, tales como, por ejemplo, enlaces peptídicos, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfotriésteres, 2'-O-metil ARN, 2'-O-Mt ARN, P-etoxi ADN, y P-etoxi-2'-O-Mt ARN también están fácilmente disponibles y son conocidos en la técnica anterior. Además, la utilización de sondas reticulables en los ensayos de
 20 hibridación de ácidos nucleicos para reticular secuencias diana es conocida en la técnica anterior. Por ejemplo, se describen compuestos basados en furocumarina o psoraleno unidos a moléculas de ácidos nucleicos a través de la formación de aductos en la patente de EE.UU. No. 4.826.967 y la patente de EE.UU. No. 5.082.934, describen un análogo de nucleósido fotoactivable que comprende un resto de cumarina unido a través de su anillo de fenilo a la posición 1 de un resto de un azúcar ribosa o desoxirribosa en ausencia de un resto de base intermedio.

25 Los análogos y miméticos de ácidos nucleicos tienen estructuras químicas similares a las moléculas de ácido nucleico nativas pero con modificaciones únicas. Los análogos de ácidos nucleicos, tales como los ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ácidos nucleicos peptídicos (PNA), y morfolinis, mejoran las capacidades de las moléculas de ácido nucleico tradicionales más allá de las limitaciones asociadas con la química estándar de los ácidos nucleicos (Karkare S y Bhatnagar D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006 71:575-586.) Dichos análogos de ácidos nucleicos expanden y mejoran en gran medida las capacidades para detectar e identificar secuencias de ácidos nucleicos relacionadas.

35 En algunos aspectos, una molécula de ácido nucleico aislada de la presente invención comprende además uno o más nucleótidos heterólogos. La expresión "nucleótidos heterólogos" en el presente documento se refiere a un nucleótido o nucleótidos que no son una parte natural de la molécula de ácido nucleico aislada, pero que están unidos de forma natural o artificial a la molécula de ácido nucleico aislada. Se incluyen entre los ejemplos de secuencia de ácido nucleico heteróloga, sin constituir limitación, una secuencia vector, una secuencia que es complementaria a una secuencia de bases de una sonda de purificación, y una secuencia que comprende uno o
 40 más sitios de enzimas de restricción.

En una realización, el nucleótido o nucleótidos heterólogos comprenden una secuencia que es complementaria a una secuencia de bases de una sonda de purificación. La sonda de purificación puede estar unida a soportes sólidos, tales como, por ejemplo, una matriz o partículas libres en solución. Se incluyen entre los ejemplos no
 45 limitantes de un soporte sólido nitrocelulosa, nailon, vidrio, poliacrílico, polímeros mezclados, poliestireno, polipropileno silano y partículas con atracción magnética. Por ejemplo, la sonda de purificación, que puede comprender una secuencia de ADN o ARN, se puede marcar con etiquetas de amina o biotina a través de un agente de reticulación. Estas sondas de purificación marcadas con amina o biotina, a continuación, son susceptibles a estrategias de inmovilización y detección que permiten interacciones *in vitro* ácido nucleico:ácido nucleico o proteína:ácido nucleico. Por lo tanto, la hibridación del segmento heterólogo de la molécula de ácido nucleico aislada con su secuencia complementaria de bases de la sonda de purificación puede facilitar la purificación de muestras de moléculas que hibridan con un segmento de secuencia específico del virus de la molécula de ácido nucleico aislada. La patente de EE.UU. No. 6.534.273, describe un procedimiento para la captura de una molécula de ácido nucleico
 50 diana en una muestra sobre un soporte sólido.

55 En una realización, las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención se unen a un soporte sólido, tal como los descritos anteriormente.

En algunas realizaciones, el nucleótido o nucleótidos heterólogos comprenden una o más secuencias de bases de repetición, por ejemplo, una o más secuencias de bases de repetición que son complementarias a una o más secuencias de bases de repetición de la sonda de purificación. Una secuencia de bases de repetición puede ser una secuencia de bases de repetición regular, tales como las formadas, por ejemplo, por homopolímeros de ácidos nucleicos de poli-adenina (A_n), poli-timina (T_n), poli-citosina (C_n), poli-(guanina G_n), y poli-uridina (U_n). Las secuencias de repetición también pueden incluir polímeros mezclados, tales como repeticiones de AT ([AT]_n), y
 60 similares.

65

El número de bases de la secuencia de bases de repetición del nucleótido o nucleótidos heterólogos de la molécula de ácido nucleico aislada puede ser igual, mayor, o menor que el número de bases de la secuencia de bases de repetición de la sonda de purificación. Las longitudes de las secuencias de repetición complementarias pueden determinar la temperatura de fusión (T_f) del segmento heterólogo: complejo de sonda de purificación. En una realización, la secuencia de bases de repetición del segmento heterólogo es más larga que la secuencia de bases de repetición complementaria de la sonda de purificación. En otra realización, la secuencia de bases de repetición del segmento heterólogo o la sonda de purificación pueden ser, como mínimo, de aproximadamente 5 bases de longitud, ilustrativamente, de aproximadamente 5 a aproximadamente 40, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 20, y similares.

En otras realizaciones, el nucleótido o nucleótidos heterólogos comprenden una secuencia de control unida de forma funcional. En una realización, la secuencia de control es una secuencia potenciadora o promotora que es reconocida específicamente por una ARN polimerasa que se une a esa secuencia e inicia la transcripción para producir transcritos de ARN. Se incluyen entre los ejemplos de promotores reconocidos por una ARN polimerasa promotores tales como T3, T7, o SP6. Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico aislada se puede utilizar en una variedad de ensayos basados en ácidos nucleicos, incluyendo ensayos que utilizan una ARN polimerasa para producir múltiples transcritos de ARN, tales como, por ejemplo, el ensayo de amplificación mediada por transcripción (TMA), tal como se describe en *Nature* 350: 91-92 (1991) y la patente de EE.UU. No. 5.399.491.

En una realización, las secuencias de ácido nucleico aisladas de la presente invención están marcadas, por ejemplo, marcadas de forma radiactiva, quimioluminiscente, fluorescente, fosforescente o con colorantes infrarrojos o con una etiqueta Raman de superficie aumentada o partícula de resonancia de plasmón (PRP). Por ejemplo, las modificaciones de nucleótidos incluyen la adición de acridina o derivados de la misma, Acrydite[®], amina, biotina, BHQ-1[®], BHQ-2[®], BHQ-3[®], dNTP de borano, espaciadores de carbono (por ejemplo, C₃, C₆, C₇, C₉, C₁₂ o C₁₈), azul cascada, colesterol, cumarina o derivados de la misma, Cy3[®], Cy3.5[®], Cy5[®], Cy5.5[®], Cy7[®], DABCYL, dansilcloruro, digoxigenina, dinitrofenilo, biotina dual, EDANS, 6-FAM, fluoresceína, 3'-glicerilo, HEX, IAEDANS, dA invertido, dG invertido, dC invertido, dG invertido, IRD-700, IRD-800, JOE, Azul La Jolla, agrupaciones de metales, tales como nanopartículas de oro, ácido fenilborónico, fosfato psoraleno, 3'-fosforilación o 5'-fosforilación, pireno, 3' ribo-adenosina, 3' ribo-guanosina 3' ribo-citidina, (LC)Red640, (LC)Red705, rodamina, ROX, tiol (SH), espaciadores, TAMRA, TET, AMCA-S[®], SE, BODIPY[®], Marina Blue[®], Oregon Green[®], Pacific Blue[®], QSY7[®], Rhodamine Green[®], Rhodamine Red[®], Rhodol Green[®], tetrametilrodamina, Texas Red[®], modificador de NH₂ Uni-Link, marcadores radiactivos (por ejemplo, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³H) y nanopartículas. Un experto en la materia conoce diversas técnicas de marcaje.

Las etiquetas pueden estar unidas directamente o indirectamente a la molécula de ácido nucleico aislada. El marcaje de un ácido nucleico se puede llevar a cabo mediante la unión covalente de un grupo detectable (etiqueta), por ejemplo, a una posición interna o bien a una terminal. Un experto en la materia conoce que existen diversas formas para derivatizar oligonucleótidos con funcionalidades reactivas que permiten la adición de una etiqueta. Están disponibles varias estrategias para unir etiquetas directamente a moléculas de ácido nucleico y para biotinilar sondas de manera que se pueden unir etiquetas radiactivas, fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimáticas, o electrodensas a través de la avidina. Se incluyen entre los ejemplos no limitativos de referencias que describen etiquetas y procedimientos de marcaje de ácidos nucleicos la patente de EE.UU. No. 4.605.735, la patente de EE.UU. No. 4.757.141; la patente de EE.UU. No. 6.965.020; Nucl. Acids Res. 5:363 (1978); Nucl. Acids Res. 13: 1529 (1985); Nucl. Acids Res. 15:3131 (1987); Nucl. Acids Res. 15:6455 (1987); Nucl. Acids Res. 13:4485 (1985); Nucl. Acids Res. 15:4837 (1987), y Anal. Biochem. 169:1-25 (1988).

En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico aisladas están marcadas para procedimientos de detección que utilizan transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). La FRET utiliza dos colorantes, un colorante donador y un aceptor. La FRET puede ser detectada tanto por la fluorescencia del colorante aceptor ("fluorescencia sensibilizada") si dicho aceptor es fluorescente de por sí, o por extinción de la fluorescencia del colorante donador si dicho aceptor es un colorante no fluorescente de extinción. La FRET se puede retrasar si el colorante donador libera su fluorescencia con el tiempo. Este proceso se denomina "TR-FRET" o "FRET resuelta en el tiempo". Los colorantes donador y aceptor también pueden ser los mismos, en cuyo caso la FRET se detecta por la despolarización de la fluorescencia resultante. Los colorantes también se pueden acoplar covalentemente para formar un colorante fluorescente en tándem o colorante en tándem o conjugado en tándem. Por ejemplo, un único colorante donador es entonces capaz de excitar dos colorantes aceptores simultáneamente, dando lugar a la emisión de luz de múltiples longitudes de onda. Preferentemente, el perfil de longitudes de onda de la emisión del donador debe superponerse, como mínimo, parcialmente con el perfil de longitudes de onda de absorción del aceptor.

Se incluyen entre los colorantes fluorescentes que se pueden utilizar, sin constituir limitación, BODIPY FL, Cy3[®], Cy3.5[®], Cy5.RTM., Cy5.5[®], EDANS, FAM, fluoresceína, HEX, IAEDANS, JOE, Oregon Green[®], (LC)Red640, (LC)Red705, ROX, TAMRA, TET, tetrametilrodamina y Texas Red[®].

Entre los colorantes de extinción se incluyen, sin constituir limitación, BHQ-1[®], BHQ-2[®], BHQ-3[®], DABCYL, agrupaciones de metales, tales como nanopartículas de oro y QSY7[®].

Entre los pares donador/aceptor que se pueden utilizar se incluyen, sin constituir limitación, FAM/BHQ-1, TET/BHQ-1, JOE/BHQ-1, HEX/BHQ-1, Oregon Green/BHQ-1, TAMRA/BHQ-2, ROX/BHQ-2, Cy3/BHQ-2, Cy3.5/BHQ-2, Texas Red/BHQ-2, Texas Red/BHQ-2, Cy5/BHQ-3, Cy5.5/BHQ-3, fluoresceína/tetrametilrodamina, fluoresceína/fluoresceína, fluoresceína/QSY7, fluoresceína/LC Red640, fluoresceína/LC Red705, IAEDANS/fluoresceína, EDANS/DABCYL, y BODIPY FLI/BODIPY FL.

También se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos, tal como se indica en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, o un complemento de las mismas, en la que la molécula de ácido nucleico comprende además una etiqueta detectable.

En algunas realizaciones, la etiqueta detectable se corresponde con un par donador/aceptor adecuado para la detección utilizando FRET.

En otras realizaciones, el par donador/aceptor es FAM/BHQ-1.

En aún otras realizaciones, la presente invención da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos, tal como se indica en la SEQ ID NO: 3, en la que la molécula de ácido nucleico comprende FAM en el extremo 5' y BHQ-1 en el extremo 3'.

En otras realizaciones, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden proporcionar la utilización simultánea de dos o más sondas que utilizan la transferencia de energía donador-aceptor mediante la cual, por ejemplo, se preparan balizas moleculares que poseen fluoróforos de diferentes colores, lo que permite que se lleven a cabo ensayos de forma simultánea para detectar diferentes dianas en la misma reacción. Por ejemplo, los ensayos múltiples pueden contener varios conjuntos de cebadores diferentes, permitiendo cada conjunto la amplificación de una secuencia de gen única a partir de un VHA diferente, y puede estar presente un número correspondiente de balizas moleculares, conteniendo cada una una secuencia de sonda específica para uno de los amplicones, y cada una marcada con un fluoróforo de un color diferente. El color de la fluorescencia resultante, si existe, identifica el VHA en la muestra, y el número de ciclos de amplificación requerido para generar fluorescencia detectable proporciona una medida cuantitativa del número de organismos diana presentes. Si está presente más de un tipo de VHA en la muestra, los colores fluorescentes que se producen identifican cuales son los que están presentes.

En otros aspectos, la presente invención da a conocer una composición que comprende una o más de las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención. En algunas realizaciones, la composición es una solución tamponada. En otras realizaciones, la composición está liofilizada.

En una realización, la composición comprende un par de cebadores que tienen la secuencia, tal como se indica en (SEQ ID NO: 1 / SEC ID NO: 2).

En una realización, la composición comprende, además, una sonda que tiene la secuencia, tal como se indica en la SEC ID NO: 3, o un complemento de la misma.

En otra realización, se da a conocer una composición que comprende un primer, un segundo, y/o un tercer par de cebadores, en la que el primer par de cebadores tiene la secuencia, tal como se indica en (SEQ ID NO: 1 / SEC ID NO: 2). En una realización, la composición comprende, además, una primera, una segunda, y/o una tercera sonda, en la que la primera, la segunda y/o la tercera sonda comprenden cada una una etiqueta detectable adecuada para su utilización en una PCR múltiple en tiempo real.

En otras realizaciones, la composición comprende un par de cebadores que tienen la secuencia, tal como se indica en (SEQ ID NO: 1 / SEC ID NO: 2) y una sonda que tiene la secuencia, tal como se indica en la SEQ ID NO: 3, o un complemento de la misma.

En una realización, la composición comprende, además de la molécula o moléculas de ácido nucleico de la presente invención, reactivos adicionales, tales como ADN polimerasa, cofactores, y desoxirribonucleósido-5'-trifosfatos en concentraciones adecuadas para obtener una amplificación del ácido nucleico diana. A modo de ejemplo, en algunas realizaciones, en las que la composición es una solución de PCR, la cantidad mínima de ADN polimerasa puede ser, como mínimo, de aproximadamente 0,5 unidades/100 µl de solución, de manera ilustrativa, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 25 unidades/100 µl de solución y de aproximadamente 7 a aproximadamente 20 unidades/100 µl de solución. Otras cantidades pueden ser útiles para una reacción o sistema de amplificación dados. La "unidad" se puede definir como la cantidad de actividad enzimática requerida para incorporar 10 nmoles de nucleótidos totales (dNTP) en una cadena de ácido nucleico que se extiende en 30 minutos a 74°C. A modo de otro ejemplo, en otras realizaciones, la cantidad de cada cebador utilizado en la amplificación puede ser, como mínimo, de aproximadamente 0,075 µmolar, ilustrativamente, de aproximadamente 0,075 a aproximadamente 2 µmolar, pero pueden ser útiles otras cantidades para una reacción o sistema de amplificación dados. A modo de otro ejemplo adicional, en algunas realizaciones, la cantidad de cada dNTP en la solución puede ser de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 3,5 mmolar, pero otras cantidades pueden ser útiles para una

reacción o sistema de amplificación dados.

En otros aspectos, la presente invención da a conocer un procedimiento de amplificación de una secuencia diana correspondiente a un VHA, tal como se define en la reivindicación 4.

Por ejemplo, llevar a cabo una PCR con la secuencia diana y, como mínimo, un cebador directo y un cebador inverso, cada uno capaz de hibridar con la secuencia diana en una condición adecuada de PCR, puede proporcionar la amplificación de la secuencia diana.

En una realización, la presente invención da a conocer un procedimiento de amplificación de una secuencia diana, comprendiendo el procedimiento: llevar a cabo una PCR con la secuencia diana como plantilla, en la que la realización comprende proporcionar a la PCR un cebador directo que comprende la secuencia, tal como se indica en la SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso que comprende la secuencia, tal como se indica en la SEQ ID NO: 2. En una realización, la secuencia diana corresponde a ADNc preparado a partir de ARN de una muestra que comprende un VHA.

En otros aspectos, la presente invención da a conocer un procedimiento para la determinación del VHA en una muestra. Por ejemplo, la muestra puede comprender ARN de VHA o la muestra puede ser una muestra en la que se tiene que determinar la presencia o ausencia de VHA.

En una realización, la presente invención da a conocer un procedimiento para la determinación de VHA en una muestra, comprendiendo el procedimiento:

- a. llevar a cabo una PCR con una plantilla de ácido nucleico en la muestra utilizando un cebador directo que comprende la secuencia, tal como se indica en la SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso que comprende la secuencia, tal como se indica en la SEQ ID NO: 2; y
- b. detectar un amplicón generado por el cebador directo y el cebador inverso, en el que la presencia del amplicón determina el VHA en la muestra.

En una realización, la plantilla es un ADNc preparado a partir de ARN de una muestra que comprende un VHA.

La etapa de detección se puede llevar a cabo mediante diversas técnicas conocidas para un experto en la materia. En una realización, el amplicón se puede detectar utilizando una sonda que está marcada para su detección y se puede hibridar directa o indirectamente con el amplicón. La sonda puede ser soluble o puede estar unida a un soporte sólido.

En una realización, la sonda comprende una etiqueta detectable que corresponde a un par donador/aceptor adecuado para la detección mediante la utilización de FRET, en la que la sonda comprende una secuencia, tal como se indica en la SEQ ID NO: 3, o un complemento de la misma. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el par donador/aceptor es FAM/BHQ-1.

En otra realización, uno o más de los cebadores utilizados para amplificar el ácido nucleico diana puede estar marcado, por ejemplo, con una fracción de unión específica. El producto de extensión del cebador resultante, en el que se ha incorporado el cebador marcado puede ser capturado con una sonda. La detección de la diana amplificada hibridada con la sonda puede conseguirse mediante la detección de la presencia de la sonda marcada o de la diana amplificada marcada utilizando equipos y procedimientos de detección adecuados que son muy conocidos en la técnica.

En otras realizaciones, uno o más de los cebadores utilizados para amplificar el ácido nucleico diana está marcado con biotina y los ácidos nucleicos diana amplificados biotinilados se hibridan a sondas unidas a un soporte sólido. Las dianas unidas son detectadas, a continuación, poniéndolas en contacto con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa en presencia de un oxidante, tal como peróxido de hidrógeno, y una composición formadora de colorante adecuada.

Son conocidas otras técnicas por un experto en la materia para la detección que incluyen, sin constituir limitación, procedimientos que implican transferencia Southern, técnicas de transferencia de puntos, o detección por captura no isotópica con una sonda marcada.

En otras realizaciones, la presente invención da a conocer un procedimiento para la determinación de VHA en una muestra, comprendiendo el procedimiento:

- a. llevar a cabo una única PCR con la muestra, comprendiendo la PCR un cebador directo que comprende la secuencia, tal como se indica en la SEQ ID NO: 1 y un cebador inverso que comprende la secuencia, tal como se indica en la SEQ ID NO: 2; y
- b. detectar un amplicón generado por los cebadores directo e inverso, en el que la presencia del amplicón determina la presencia de VHA en la muestra.

En una realización, la etapa de detección comprende incluir en la PCR una sonda de oligonucleótidos que comprende una etiqueta detectable que corresponde a un par donador/aceptor adecuado para la detección utilizando FRET, en el que la sonda comprende una secuencia, tal como se indica en la SEC ID NO: 3, o un complemento de la misma. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el par donador/aceptor es FAM/BHQ-1.

Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden utilizarse solas o en combinación en diversos procedimientos de amplificación y/o determinación de VHA. Por consiguiente, en algunas realizaciones, las composiciones, procedimientos y kits de la presente invención dan a conocer un ensayo de PCR, un ensayo de PCR en tiempo real, y/o un ensayo de PCR múltiple en tiempo real, en el que en función del tipo de ensayo, el ensayo puede comprender uno, dos, tres o más conjuntos de cebadores y sondas de la misma mezcla maestra de PCR. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un ensayo de PCR múltiple en tiempo real puede detectar genotipos de VHA diferentes utilizando un solo ensayo. En este sentido, los cebadores y sondas son capaces de interactuar solamente con sus dianas específicas y no con otros cebadores y sondas presentes en la mezcla maestra (por ejemplo, no forman cebadores dímeros) proporcionando de este modo una amplificación de la diana y detección por PCR eficientes, por ejemplo, PCR múltiple.

En otros aspectos, los cebadores/sondas de la presente invención se pueden utilizar en procedimientos cuantitativos. La cuantificación del VHA puede ser, por ejemplo, mediante procedimientos semicuantitativos o cuantitativos, tales como los conocidos por un experto en la materia.

En una realización, se pueden generar resultados semicuantitativos de RT-PCR mediante el muestreo de la mezcla de reacción de RT-PCR seguido, por ejemplo, de análisis de transferencia de puntos.

En otra realización, los procedimientos cuantitativos pueden utilizar técnicas de RT-PCR no competitivas o competitivas.

La RT-PCR no competitiva puede incluir, por ejemplo, la coamplificación del ARN de VHA diana con una segunda molécula de ARN bajo concentraciones de reactivos y condiciones de manera que no haya competencia entre la diana y el estándar, y con la que no comparte ni los sitios de reconocimiento del cebador, ni ninguna secuencia interna.

En la RT-PCR competitiva, el estándar interno comparte el mismo sitio de reconocimiento del cebador y las secuencias internas con la diana primaria, lo que conduce a la competencia por los reactivos. Ambos se pueden amplificar con la misma o sustancialmente la misma eficacia y sus amplicones se pueden distinguir mediante la adición de una enzima de restricción para el estándar, mediante la variación de su tamaño, etc. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una serie de tubos de PCR que contienen el ARN de VHA diana se tratan con diluciones seriadas de números de copia del estándar interno conocidos. Cuanto mayor es la concentración del estándar interno, es más probable que los cebadores se unan y lo amplifiquen, en lugar de la diana. Una comparación de las intensidades de amplicones estándar teñidos con bromuro de etidio y dianas, por ejemplo, seguido de una electroforesis en gel, permite la cuantificación de la diana.

En una realización, el procedimiento puede implicar la adición de cantidades conocidas de competidores amplificables por RT-PCR a las muestras de ARN de VHA antes de la RT, que, preferentemente, son moléculas sintéticas de ARN de VHA.

En otra realización, la presente invención da a conocer un ensayo de PCR en tiempo real cuantitativo, por ejemplo, un ensayo de PCR de punto final seguido por la detección con la secuencia de la sonda que se describe en el presente documento mediante la utilización de detección por transferencia Southern, transferencia de puntos, fluorescente, o colorimétrica o de otros procedimientos cualitativos o cuantitativos conocidos para la detección del ácido nucleico.

En otros aspectos, la presente invención da a conocer un kit que comprende las moléculas de ácido nucleico aisladas, que incluye los cebadores y sondas de la presente invención. El kit se puede desarrollar utilizando las secuencias de ácidos nucleicos descritas en el presente documento. Estas secuencias se pueden utilizar como cebadores en reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, y/o como sondas en un procedimiento de hibridación de ácidos nucleicos. Los kits son útiles para la determinación de la presencia de un ácido nucleico de VHA en una muestra. Los componentes en el kit se pueden obtener comercialmente o bien se pueden preparar según procedimientos muy conocidos en la técnica. Además, los componentes del kit pueden estar en solución o liofilizados, según sea apropiado. En una realización, los componentes están en el mismo compartimento, y en otra realización, los componentes están en compartimentos separados. En algunas realizaciones, el kit comprende además instrucciones para su utilización.

En una realización, el kit comprende un cebador directo, un cebador inverso, y una sonda, en el que el cebador directo comprende una secuencia de ácido nucleico de cebador directo, tal como se indica en (SEC ID NO: 1), en el que el cebador inverso comprende una secuencia de ácido nucleico de cebador inverso, tal como se indica en (SEQ ID NO: 2), en el que la sonda comprende una secuencia de ácido nucleico de sonda, tal como se indica en (SEQ ID

NO: 3), o un complemento de las mismas.

Los siguientes ejemplos se presentan sólo a modo de ilustración.

5 EJEMPLOS

Ejemplo 1

Determinación de VHA mediante RT-PCR

10

Para determinar la presencia de ARN de VHA en una muestra de plasma, se llevó a cabo un ensayo de RT-PCR.

Se utilizaron los cebadores y la sonda de detección que tenían las siguientes secuencias:

15 Cebador directo: 5'-GCG CCC GGC GGG GTC AAC TCC AT-3' (SEC ID NO: 1);
Cebador inverso: 5'-AGC CAA GTT AAC ACT GCA AGG-3' (SEC ID NO: 2);
Sonda: 5'-TTA GCA TGG AGC TGT AGG AGT CTA AAT TGG GG -3' (SEC ID NO: 3).

La sonda se marcó con FAM en el extremo 5' y con BHQ-1 en el extremo 3'.

20

Se preparó una mezcla madre maestra de RT-PCR (MMX) que comprendía lo siguiente: 2x mezcla de reacción de PCR de Invitrogen; 400 µM de dNTP, 4,0 mM de MgCl₂; 1x colorante de referencia ROX (0,5 µM); 400 nM de cebador directo; 400 nM de cebador inverso; 50 nM de sonda; 100 nM de la sonda de Control Interno; 1 µl / 50 µl de reacción de PCR de Transcriptasa Inversa de Una Etapa SSIII de Invitrogen (RT) y mezcla de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA).

25

La MMX se combinó con ARN viral aislado a partir de muestras de plasma que contienen el virus utilizando un procedimiento de extracción de virus conocido en la técnica. El ARN de HAV / MMX combinado se sometió a una PCR de una etapa, en la que la transcripción inversa, la amplificación de ADNc, y la detección ocurrieron en el mismo tubo, utilizando un instrumento de PCR en tiempo real comercial (Applied Biosystems 7300). Las condiciones de ciclaje térmico se muestran en la tabla 1:

30

Tabla 1: PCR condiciones de ciclaje.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
55°C	30 min	1
95°C	3 min	1
95°C	15 s	45
56°C	1min	

35

Después de la amplificación por PCR, se analizaron las señales generadas utilizando el programa del instrumento. Los resultados mostraron curvas de amplificación fuertes.

LISTADO DE SECUENCIAS

40

<110> Grifols Therapeutics Inc. Burde, Stefan Buno,
Brett Wronska, Danuta

45

<120> PROCEDIMIENTOS, COMPOSICIONES Y KITS PARA LA DETERMINACIÓN DEL VIRUS DE LA
HEPATITIS A

<130> T126 2200WO

<150> US 61/531,818

50

<151> 07-09-2011

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

55

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

60

ES 2 586 678 T3

	<220>		
	<223>	Virus de la Hepatitis A	
5	<400>	1	
		gcgcccgcg gggtaactc cat	23
10	<210>	2	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
15	<220>		
	<223>	Virus de la Hepatitis A	
	<400>	2	
		agccaagtta aactgcaag g	21
20	<210>	3	
	<211>	32	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
25	<220>		
	<223>	Virus de la Hepatitis A	
30	<400>	3	
		ttagcatgga gctgtaggag tctaaattgg gg	32

REIVINDICACIONES

1. Molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos, o un complemento de la misma, tal como se indica en:
- 5' - GCG CCC GGC GGG GTC AAC TCC AT - 3' (SEC ID NO: 1);
5' - AGC CAA GTT AAC ACT GCA AGG - 3' (SEC ID NO: 2), o
5' - TTA GCA TGG AGC TGT AGG AGT CTA AAT TGG GG - 3' (SEC ID NO: 3).
2. Composición que comprende un par de cebadores de oligonucleótidos que comprende un cebador directo que tiene una secuencia, tal como se indica en la SEC ID NO: 1 y un cebador inverso que tiene una secuencia, tal como se indica en la SEC ID NO: 2, en la que el par de cebadores es capaz de hibridarse con una secuencia diana en condiciones de PCR para amplificar la secuencia diana.
3. Composición, según la reivindicación 2, que además comprende una sonda de oligonucleótidos que tiene la secuencia, tal como se indica en la SEC ID NO: 3, en la que la sonda es capaz de hibridarse con la secuencia diana.
4. Procedimiento de amplificación de una secuencia diana, comprendiendo el procedimiento:
- llevar a cabo una PCR con la secuencia diana como plantilla, en el que la realización comprende proporcionar a la PCR un cebador directo que comprende la secuencia, tal como se indica en la SEC ID NO: 1 y un cebador inverso que comprende la secuencia, tal como se indica en la SEC ID NO: 2.
5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que la secuencia diana corresponde a un ADNc preparado a partir de ARN de una muestra que comprende un VHA.
6. Procedimiento para la determinación de VHA en una muestra, comprendiendo el procedimiento:
- a. llevar a cabo una PCR con una plantilla de ácido nucleico en la muestra utilizando un cebador directo que comprende la secuencia, tal como se indica en la SEC ID NO: 1 y un cebador inverso que comprende la secuencia, tal como se indica en la SEC ID NO: 2, y
b. detectar un amplicón generado por el cebador directo e inverso, en el que la presencia del amplicón determina si el VHA está presente en la muestra.
7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que la detección comprende proporcionar una sonda de polinucleótidos a la PCR mediante la cual el amplicón, si está presente, se pone en contacto con la sonda, en el que la sonda comprende la secuencia, tal como se indica en la SEC ID NO: 3 o un complemento de la misma.
8. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que la sonda está marcada con FAM/BHQ-1.
9. Kit que comprende una o más de las moléculas de ácido nucleico aisladas, según la reivindicación 1.