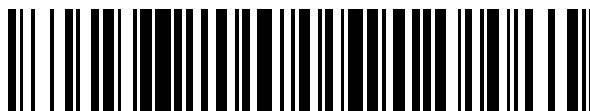


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 251**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2009** **PCT/US2009/062114**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2010** **WO10051261**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2009** **E 09797216 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016** **EP 2358915**

54 Título: **Un marcador genético para la detección del virus del papiloma humano**

30 Prioridad:

31.10.2008 US 197850 P

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

31.10.2016

73 Titular/es:

TROVAGENE, INC. (100.0%)
11055 Flintkote Avenue
San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

MELKONYAN, HOVSEP, S.;
UMANSKY, SAMUIL, R. y
XIN, ZHENGHAN

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 588 251 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

Un marcador genético para la detección del virus del papiloma humano

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a los campos de la medicina y la biología molecular. Más específicamente, la invención se refiere al uso del fragmento del gen E1 del genoma del papilomavirus como un marcador específico para el diagnóstico diferencial por detección de los genotipos del VPH de alto riesgo más comunes contra sus contrapartes de bajo riesgo.

Antecedentes de la invención

De acuerdo con las últimas estimaciones globales, 493.000 casos nuevos de cáncer de cérvix ocurren cada año entre las mujeres, y 274.000 mujeres mueren por la enfermedad anualmente (Jacques Ferlay et al., 2002, GLOBOCAN). Debido a los avances de la enfermedad durante muchos años, 1,4 millones estimados de mujeres en todo el mundo están viviendo con cáncer de cérvix y de dos a cinco veces más o hasta 7 millones de mujeres en todo el mundo, pueden tener afecciones precancerosas que necesitan identificarse y tratarse (Ferlay et al. 2002, GLOBOCAN; Bosch et al. 2002, J Clin Pathol. 55: 244-265). La carencia de estrategias de barrido y de tratamiento eficaces es una razón principal para las tasas de cáncer de cérvix significativamente mayores en países en desarrollo en comparación con países desarrollados.

Los esfuerzos de barrido han confiado en gran medida en el frotis Pap, un ensayo de laboratorio desarrollado en la década de 1940 para detectar células de cérvix anómalas. El ensayo ha logrado un éxito tremendo en países industrializados que ofrece un barrido periódico de alta calidad. Pero los programas del frotis Pap son complejos y costosos de ejecutar y han fallado en alcanzar una proporción significativa de mujeres en países en desarrollo donde los sistemas y las infraestructuras de salud son débiles. De forma importante, en algunos países las mujeres no realizan o consienten el procedimiento del frotis Pap debido a las restricciones culturales. Adicionalmente, hay problemas analíticos asociados al ensayo del frotis Pap. El frotis Pap no detecta todos los casos de displasia de cérvix o de premalignidad. La tasa actual aceptable de falsos negativos para un ensayo que guíe al médico a realizar una recomendación médica es aproximadamente el 5-10 % pero estudios recientes sugieren que la tasa real de frotis Pap puede ser mucho mayor (Nanda K. et al., 2000, Ann Intern Med. 132:810-819; Kulasingam S. et al, 2002, JAMA. 288: 1749-1757). El frotis Pap define aproximadamente el 7-8 % de los casos de células escamosas atípicas de significancia indeterminada (ASCUS). En un 20-30 % adicional de los casos, el frotis Pap puede ser insuficiente para la interpretación debido a la presencia de células inflamatorias. Actualmente, para superar las deficiencias asociadas al ensayo del frotis Pap se están realizando más estudios para desarrollar nuevos ensayos analíticamente más fiables para la detección temprana de la afección premaligna del cérvix en mujeres. Una de las aproximaciones, basadas en la conexión universalmente aceptada entre la infección de VPH consistente del cérvix y el desarrollo de cáncer cervical invasivo se dirige a la detección del virus.

Gregoire, L. et al, Journal of Clinical Microbiology, dic. 1989, p2660-2665 describe la amplificación de secuencias de ADN del virus del papiloma humano usando cebadores que corresponden a secuencias del VPH altamente conservadas. El documento EP1895018A2 describe ciertas sondas y cebadores para la detección del VPH. Ylito, N. et al, Journal of Clinical Microbiology, julio 1995, p1822-1828 se refiere a la detección de VPH genital por PCR anidada de tubo único e hibridación de oligonucleótido específico de tipo.

DAPONTE A ET AL: "Use of real-time PCR to detect human papillomavirus-16 viral loads in vaginal and urine self-sampled specimens." CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION, vol. 14(6), junio 2008, páginas 619-621, desvela un método de PCR a tiempo real para detectar carga vírica de VPH-16 en especímenes de orina auto-muestreados. Los cebadores usados para detectar la carga vírica de VPH-16 son específicos para el gen E1 o el E6. Los cebadores que se unen al gen E1 del genoma del VPH-16 se unen en los residuos 1112 - 1131 y 1263 - 1283, respectivamente.

Sumario de la invención

La invención proporciona composiciones y métodos para la detección diferencial del tipo de VPH de alto riesgo. Específicamente, se usa un fragmento nuevamente identificado del genoma del VPH como un marcador para esta detección diferencial de los virus de tipo alto riesgo. Las composiciones de oligonucleótidos sonda y cebador que marcan como diana este fragmento de marcador se usa para detectar VPH de alto riesgo en muestras clínicas tales como orina.

Específicamente, la invención proporciona un método para diagnosticar una infección por virus del papiloma humano (VPH) en un paciente, incluyendo las etapas de: (a) obtener una muestra de orina de dicho paciente; y (b) detectar una o más secuencias del gen E1 del VPH en dicha muestra de orina, comprendiendo la detección el uso del par de cebadores SEQ ID NO:41 y 42 y en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde detectar una o más secuencias del gen E1 del VPH indica la presencia de al menos un virus del papiloma humano, diagnosticando de

esta manera una infección por VPH en un paciente. De acuerdo con este método, los ácidos nucleicos son ADN o ARN. En una realización preferida de este método, el ADN es ADN transrenal. Este método detecta el ADN del VPH que comprende ADN transrenal. Alternativamente, este método detecta ADN transrenal, exclusivamente.

- 5 En ciertas realizaciones del presente método, la etapa de detección incluye una técnica seleccionada de PCR de cebador anidado o PCR en Tiempo Real.

La etapa de detección incluye una reacción en cadena de la polimerasa que usa pares de cebadores suficientemente complementarios para hibridar con una secuencia en el gen E1 del VPH. Además, la etapa de
10 detección incluye una reacción en cadena de la polimerasa que usa pares de cebadores suficientemente complementarios para hibridar con una secuencia codificada por SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, o 97. Alternativamente, o además, la etapa de detección incluye una reacción en cadena de la polimerasa que usa pares de cebadores suficientemente
15 complementarios para hibridar con una secuencia codificada por SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 o una secuencia complementaria de los mismos. Específicamente, la reacción en cadena de la polimerasa usa el par de cebadores de SEQ ID NO: 41 y 42. El par de cebadores de SEQ ID NO: 41 y 42 detecta diferencialmente las formas de alto riesgo del VPH.

En ciertas realizaciones de la invención, se añaden múltiples pares de cebadores a la reacción de PCR contenidos
20 en un único tubo. Las reacciones de la PCR en grupo incluyen 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25 cebadores o cualquier número en el medio. Las reacciones de PCR en grupo se usan para identificar todas las formas posibles del VPH que están presentes en una muestra biológica o clínica de orina. Por ejemplo, los cebadores listados en la Tabla 3, la Tabla 4 o la Tabla 5 se aplican a cualquier muestra dada en el contexto de una única reacción de PCR.

De acuerdo con ciertos aspectos del presente método, se reduce la degradación de ácidos nucleicos en dicha
25 muestra de orina. Reducir la degradación de ácidos nucleicos incluye inhibir la actividad nucleasa mediante el pH aumentado, la concentración aumentada de sales, la inactivación por calor o tratando dicha muestra de orina con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido etilendiaminotetraacético, guanidina HCl, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina y dodecilsulfato sódico.

La etapa de detección del presente método incluye además aislar sustancialmente dichos ácidos nucleicos en dicha
30 muestra de orina. El aislamiento se realiza por precipitación o usando un material adsorbente sólido.

El presente procedimiento comprende filtrar la muestra de orina para retirar contaminantes. En un aspecto, filtrar
35 retira los ácidos nucleicos que comprenden más de aproximadamente 1000 nucleótidos. En otro aspecto, filtrar retira ácidos nucleicos que comprenden más de aproximadamente 300 nucleótidos.

Adicionalmente, el presente método incluye además la etapa de cuantificar dichos ácidos nucleicos. La
40 cuantificación se logra por los métodos conocidos en la técnica.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un diagrama esquemático, o mapa, de los Marcos de Lectura Abiertos (ORF) en el genoma del
45 VPH16. La Figura 2 es una fotografía de un análisis de electroforesis en gel que representa productos de PCR de genotipos individuales del VPH, que se amplificaron usando cebadores que mapean el gen E1 del VPH. La Figura 3 es una fotografía de un análisis de electroforesis en gel que representa productos de PCR de genotipos individuales del VPH, que se amplificaron usando un único par de cebadores, SEQ ID: 41 y SEQ ID: 42, mapeados al gen E1 del VPH.
50 La Figura 4 es una fotografía de un análisis de electroforesis en gel que representa los productos de PCR de un ensayo de PCR del VPH llevado a cabo en ADN recogido de pacientes con cáncer de cérvix, que se amplificó usando un único par de cebadores SEQ ID: 41 y SEQ ID: 42, mapeados al gen E1 del VPH. La Figura 5 es una fotografía de un análisis de electroforesis en gel que representa los productos de PCR de genotipos individuales del VPH, que se amplificaron usando todos los cebadores específicos de alto riesgo, mapeados al gen E1 del VPH (véase, Tabla 4).
55 La Figura 6 es una fotografía de un análisis de electroforesis en gel que representa los productos de PCR de un ensayo de PCR del VPH llevado a cabo en ADN recogido de pacientes con cáncer de cérvix, que se amplificó usando la mezcla de todos los cebadores específicos de alto riesgo en un único tubo de reacción de PCR. Los cebadores mapeaban al gen E 1 del VPH. La Figura 7 es una fotografía de un análisis de electroforesis en gel que representa los productos de PCR de genotipos individuales del VPH usando un subconjunto de cebadores específicos de alto riesgo, mapeados al gen E1 del VPH (véase, Tabla 5).
60

Descripción detallada

65 Los virus del papiloma humano (VPH) son virus epiteliotrópicos asociados a lesiones benignas y malignas del

epitelio cutáneo y mucoso (Figura 1 para el mapa genético del virus). Hay conexión causal bien documentada entre la infección del VPH y el posterior desarrollo de cáncer de cérvix. También hay observaciones que asocian la infección del VPH con cánceres de cabeza y cuello, el tejido respiratorio y de mama. (Braakhuis et al., 2004, J. Natl. Cancer Inst. 96(13): 998-1006; Dahlstrand et al., 2004, Anticancer Res. 24(3b): 1829-35; Daling et al., 2004, Cancer 101 (2): 270-80; Ha et al., 2004, Crit. Rev. Oral Biol. Med. 15(4): 188-96; Hafkamp et al., Acta Otolaryngol. 124(4): 520-6; Harwood et al., 2004, Br. J. Dermatol. 150(5):949-57; Rees et al., 2004, Clin. Otolaryngol. 29(4):301-6; Widschwendter et al., 2004, J. Clin. Virol. 31(4):292-7).

Se han identificado más de 100 tipos diferentes de VPH hasta la fecha (Antonsson, A., et al., 2000, J. Virol. 74:11636-11641; Chan, S. Y., et al. 1995, J. Virol. 69:3074-3083; de Villiers, E. M., et al. 2004, Virology 324:17-27), de los cuales 40 se han informado en infecciones anogenitales (de Villiers E-M. 2001, Papillomavirus Rep. 12:57-63; Villiers EM et al., 2004, Virology. jun 20;324(1):17-27). Basándose en la clasificación epidemiológica del VPH hay 15 genotipos víricos de alto riesgo y 5 de bajo riesgo (Munoz N et al., 2003, N Engl J Med., 348, 518-527). Se acepta que cerca del 100 % de los cánceres cervicales invasivos y las neoplasias intraepiteliales precancerosas de alto grado se asocian a la infección por la infección de VPH de alto riesgo. Esta es la razón para el uso de la detección del VPH de alto riesgo para la búsqueda en mujeres y la identificación de individuos en riesgo del posterior desarrollo de cáncer cervical.

Ya que el VPH no puede cultivarse *in vitro* y los ensayos serológicos son todavía ineficaces, el diagnóstico de la infección por VPH se basa en el uso de herramientas moleculares. Se han descrito ensayos de detección directa punto-mancha y de hibridación *in situ* (Melchers WJ, et al., 1988, J Med Virol 25:11-16; Melchers WJ, 1989, J Clin Microbiol, 27:106-110) pero estos métodos son tediosos y parecen carecer de sensibilidad y especificidad. Los métodos de amplificación del ADN, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten una detección más sensible del ADN vírico. Aparte de cebadores de PCR específicos de tipo para genotipos de VPH individuales (Baay MF, et al., 1996, J Clin Microbiol, 34:745-747; van den Brule AJ, et al., 1989, J Med Virol, 29:20-27) se han desarrollado varios conjuntos de cebadores de PCR universales, incluyendo MY11/MY09 (Manos MM, et al., 1989, Cancer Cells, 7:209-214) OBI/II (Jenkins A, et al 1991, APMIS, 99:667-673) CPI/CPIIG (Tieben LM, et al., 1993, J Virol Methods, 42:265-279), GP5+/6+ (de Roda Husman AM, et al., 1995, J Gen Virol, 76:1057-1062), cebadores SPF (Kleter B, et al., 1998, Am J Pathol. dic; 153(6): 1731-9) y cebadores HP derivados de cebadores SPF (Payan C, et al., 2007, J Clin Microbiol., 45(3):897-901). Todos estos cebadores tenían el objeto de detectar todos los subtipos de VPH con posterior diferenciación de los tipos de alto riesgo de los de bajo riesgo usando sondas específicas. Similarmente, hay numerosas patentes emitidas que desvelan cebadores y sondas para la detección del VPH en especímenes clínicos (6.583.278, Junio, 2003, Carter; N. M. (E6 y E7); 6.503.704, Enero, 2003, Mahony, et al. (L1); 6.355.424, Marzo, 2002, Lorincz, et al.; 6.228.577, Mayo, 2001, Mahony, et al.; 6.218.104, Abril, 2001, Morris, et al.; 6.045.993, Abril, 2000, Mahony, et al.; 5.888.724, Marzo, 1999, Silverstein, et al.; 5.783.412, Julio, 1998, Morris, et al.; 5.705.627, Enero, 1998, Manos, et al.; 5.639.871, Junio, 1997, Bauer, et al.; 5.527.898, Junio, 1996, Bauer, et al.; 5.447.839, Septiembre, 1995, Manos, et al.; 5.283.171, Febrero, 1994, Manos, et al.; 5.182.377, Enero, 1993, Manos, et al.; 5.501.947, Marzo, 1996, Emery, et al).

La divulgación proporciona cebadores y sondas que detectan el VPH en todas las modalidades: (i) detección directa de los tipos más frecuentes de alto riesgo usando solamente amplificación de ácidos nucleicos (NA) u otros métodos analíticos, (ii) detección directa de los tipos más frecuentes de alto riesgo usando un proceso de dos etapas (amplificación de AN con un análisis posterior del producto por hibridación) y (iii) amplificación y análisis de tipos de VPH de alto y bajo riesgo en una única reacción. La invención proporciona además métodos para el diseño y el uso de cebadores de oligonucleótidos específicos de la región génica E1 del VPH. Críticamente, las composiciones y los métodos de la invención abordan una necesidad sentida desde hace tiempo para detectar, explorar y monitorizar enfermedades asociadas a la infección del VPH.

Una de las deficiencias de los ensayos actualmente disponibles de la exploración del VPH es la fuente de ADN, es decir las células cervicales. Una colección de células cervicales de un paciente requiere una visita a la consulta de un doctor y al menos un técnico entrenado, pero más probablemente, un médico certificado, para realizar la colección de especímenes. Además, el procedimiento es invasivo e incómodo para el paciente. Se sugiere que los obstáculos que preceden a la colección de las células cervicales puede ser la razón de que alrededor del 30 % de las mujeres de los Estados Unidos no tengan exámenes de frotis Pap de forma regular (Ackermann SP, et al., 1992, MMWR CDC Surveill Summ, 41: 17-25; Anderson, LM, May DS.1995, Am J Public Health, 85: 840-2). Además, hay razones religiosas y culturales distintas que limitan las visitas de las mujeres a la consulta ginecológica para el muestreo cervical y la examinación general de la vagina.

La presente invención proporciona una solución para hacer frente a los obstáculos anteriormente mencionados para la colección de células cervicales. Los métodos de la invención usan una fuente diferente de ADN de VPH, que no requiere raspados cervicales. Más bien, las composiciones y los métodos de la invención detectan el ADN de VPH en una muestra de orina obtenida a partir de un paciente. El ADN de VPH se detecta en el sedimento celular de la orina centrifugada (Payan C, et al., 2007, J Clin Microbiol., 45(3):897-901; Forslund O, et al., 1993, J Clin Microbiol., 31(8):1975-9; Song ES, et al., 2007, J Korean Med Sci., 22(1):99-104) u orina completa (50, 51, 52 Brinkman JA, et al., 2002, J Clin Microbiol., 40(9):3155-61; Sellors JW, et al., 2000, CMAJ. 163(5):513-8; Smits PH, et al., 2005, J Clin Microbiol. 2005, 43(12):5936-9). Sin embargo, los ensayos precedentes publicados se basan en PCR. La

sensibilidad clínica de estos informes no es satisfactoria debido al tamaño de los amplímeros que varían de 100 a 500 pares de bases (pb).

Actualmente, se acepta en la técnica que los AN aparecen en la orina a partir de dos fuentes, (i): células vertidas en la orina a partir del tracto genitourinario, de AN que son normalmente de alto peso molecular y (ii): AN transrenales (ADN-Tr) que cruzan la barrera del riñón a partir del torrente sanguíneo en la orina, que son normalmente fragmentos de bajo peso molecular. Los tamaños de AN transrenal de bajo peso molecular varían de aproximadamente 20 a 150 pb (Chan KC, et al., 2008, Clin Cancer Res., 14(15):4809-13; Su YH, et al., 2004, Ann N Y Acad Sci., 1022:81-9; Umansky SR, Tomei LD. 2006, Expert Rev Mol Diagn., 6(2): 153-63). La reducción del tamaño del amplicón aumenta la sensibilidad del ensayo 10 veces (Melkonyan HS, et al., 2008, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1137: 73-81). Por lo tanto, la divulgación proporciona métodos para el diseño y el uso de cebadores de oligonucleótidos que marcan como diana amplicones muy cortos (aproximadamente 30 a 50 pb). Las composiciones de cebadores de oligonucleótidos de la invención detectan eficazmente tanto el ADN de VPH liberado de las células que se vierten como el ADN-Tr en orina.

Críticamente, las composiciones de cebadores de oligonucleótidos de la invención marcan como diana un marcador genético altamente específico nuevamente identificado en el gen E1 del VPH (Tabla 1). Marcar como diana este marcador dentro del gen E1 permite el diseño de cebadores y sondas para PCR para la detección específica de genotipos de VPH de alto riesgo en una muestra clínica o biológica. La invención también proporciona cebadores específicos de VPH de alto riesgo mapeados en un área del gen E1 que amplifican fragmentos de ADN muy cortos para detectar fragmentos del genoma del VPH presentes en la fracción de ADN-Tr de la orina.

Los oligonucleótidos seleccionados de las regiones del gen E1 del VPH especificados en la Tabla 1, o las secuencias complementarias se usan para la detección del VPH en una muestra biológica o clínica.

Además, un oligonucleótido o una secuencia complementaria con al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % de homología o identidad, o cualquier punto en porcentaje entre ellos se usa para la detección del VPH en una muestra biológica o clínica. El VPH se detecta a partir de una muestra biológica o clínica usando las siguientes técnicas ejemplares, incluyendo, pero no limitadas a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y todas las variantes de este método; PCR en Tiempo Real; hibridación de AN; Reacción de Sonda Cíclica; Polimorfismo de Conformación de Hebra Única (SSCP); Amplificación de Desplazamiento de Hebra (STA); Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) y técnicas de análisis de AN que implican nanotecnología. Los cebadores pueden hibridarse a los sitios de unión que están bien inmediatamente adyacentes entre sí en la secuencia diana o bien ligeramente solapándola (sin haber secuencias interviniendo entre los sitios de unión del cebador).

Además, los oligonucleótidos seleccionados de las regiones del gen E1 del VPH (proporcionado en la Tabla 1), detectan los transcritos de ARN específicos del gen E1 mediante una reacción de PCR de transcripción reversa. Las muestras biológicas y clínicas incluyen, pero no se limitan a, cualquier fluido en el cuerpo incluyendo sangre, orina, saliva, tabique, lágrimas, semen, leche o secreciones vaginales. En una realización preferida de la invención, la muestra biológica o clínica es orina.

Se desvela además en el presente documento un kit diagnóstico para detectar el VPH, que comprende: reactivos para facilitar el aislamiento del ADN de 20-500 nucleótidos de longitud a partir de la orina; reactivos para facilitar la amplificación del ADN de 20-500 nucleótidos de longitud por la reacción en cadena de la polimerasa; una polimerasa de ADN termoestable; y un oligonucleótido específico para una secuencia marcadora que solamente aparece en el gen E1 del VPH.

Tabla 1. Alineación Múltiple de secuencias de ADN de parte del gen E1 para los genotipos de VPH de alto y bajo riesgo

[illegible]

Las técnicas de manipulación de ácidos nucleicos útiles para la práctica de la presente invención se describen en una diversidad de referencias, incluyendo pero no limitadas a Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Vol. 1-3, eds. Sambrook et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); y Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., Greene Publishing y Wiley-Interscience: New York (1987) y actualizaciones periódicas. Las descripciones específicas, aunque no se destinan a limitar el alcance de la presente invención, proporcionan una guía para practicar ciertos aspectos de la presente invención.

El ADN se somete a degradación por ADNasas presentes en los fluidos corporales, tales como la orina. La presente invención abarca varios métodos para prevenir o reducir la degradación del ADN mientras está en la orina de tal manera que estén disponibles secuencias suficientemente grandes para la detección por métodos conocidos de detección de ADN tales como aquellos descritos a continuación. En una realización, las muestras de orina se toman cuando la orina se ha mantenido en la vejiga durante menos de 12 horas, en una realización específica la orina se mantiene en la vejiga durante menos de 5 horas, más preferentemente durante menos de 2 horas. Recoger y

analizar una muestra de orina antes de que se haya mantenido en la vejiga durante un largo periodo de tiempo reduce la exposición del ADN a cualquier ADNasa presente en la orina.

En otra realización de la presente invención, después de la recolección, la muestra de orina se trata usando uno o más métodos para inhibir la actividad ADNasa. Los métodos para inhibir la actividad ADNasa incluyen, pero no se limitan a, el uso de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), HCl de guanidina, GITC (isotiocianato de guanidina), N-laurosarcosina, dodecilsulfato Na (SDS), alta concentración de sal e inactivación térmica del ADNasa.

Todavía en otra realización, después de la recolección, la muestra de orina se trata con un adsorbente que atrapa el ADN, después de lo que el adsorbente se retira de la muestra, se enjuaga y se trata para liberar el ADN atrapado para la detección y el análisis. Este método no solamente aísla el ADN de la muestra de orina, sino que, cuando se usa con algunos adsorbentes, incluyendo, pero no limitado a membranas Hybond N (Amersham Pharmacia Biotech Ltd., Piscataway, N.J.) protege el ADN de la degradación por la actividad ADNasa.

En algunos casos, la cantidad de ADN en una muestra de orina es limitada. Por lo tanto, para ciertas aplicaciones, la presente invención abarca realizaciones donde la sensibilidad de detección se aumenta por cualquier método o métodos conocidos en la técnica, incluyendo, sin limitación, uno o más de los siguientes métodos.

Donde está presente el ADN en cantidades ínfimas en la orina, pueden recogerse muestras más grandes y de esta manera concentrarse por cualquier método que no afecte a la detección del ADN presente en la muestra. Algunos ejemplos incluyen, sin limitar la amplitud de la invención, reducir el líquido presente en la muestra por concentración de butanol o por concentración usando Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway N.J.).

Puede usarse la PCR anidada para mejorar la sensibilidad varios órdenes de magnitud. Debido a la vulnerabilidad de la PCR anidada a resultados imprecisos debido a la contaminación de ADN, en una realización de la presente invención, se toman precauciones para evitar la contaminación de ADN de la muestra. Por ejemplo, sin limitar la presente invención, uno puede tratar reactivos de PCR con endonucleasa o endonucleasas de restricción que corten dentro de la secuencia diana, antes de añadirlos a la muestra de ADN de ensayo.

En una realización, la presente invención abarca purificar sustancialmente o aislar ácidos nucleicos de una muestra antes de la detección. Las moléculas de ácidos nucleicos pueden aislarse de la orina usando cualquiera de un número de procedimientos, que se conocen bien en la técnica. Cualquier método para aislar que facilite la detección del ácido nucleico diana es aceptable. Por ejemplo, el ADN puede aislarse por precipitación, como se describe por Ishizawa et al., *Nucleic Acids Res.* 19, 5972 (1991). Cuando una muestra de gran volumen contiene una concentración baja de ADN, como con la orina, se abarca un método preferido para aislar ADN. En este método, una muestra se trata con un adsorbente que actúa concentrando el ADN. Por ejemplo, una muestra puede tratarse con un material sólido que adsorberá el ADN, tales como, sin limitación, DEAE Sephadex A-25 (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway N.J.), un filtro de ADN y/o un vaso de leche. La muestra de ADN eluye del adsorbente después de que otras composiciones se laven.

En consideración de la sensibilidad de diversas técnicas de análisis de ácidos nucleicos, tales como la PCR, la presente invención también abarca métodos para reducir la presencia de ácidos nucleicos contaminantes en la muestra de orina. La contaminación de las muestras de orina por secuencias de ácidos nucleicos que no han cruzado la barrera del riñón pueden introducirse por las células que se vierten desde el revestimiento del tracto urinario, por relaciones sexuales o durante el procesamiento de la muestra de orina antes de la detección de la secuencia de ADN de interés. Sin pretender limitar la presente invención a ningún mecanismo, se cree que el ADN que pasa la barrera del riñón y que aparece en la orina parece tener de media una longitud más corta que el ADN introducido desde fuentes contaminantes debido a la fragmentación que ocurre en las células apoptóticas y en las células necróticas en el cuerpo, combinado con la acción del ADNasa en la sangre y la orina.

La filtración puede usarse para reducir el nivel de ADN contaminante en una muestra de orina antes de la detección, seleccionando secuencias más cortas de ADN. En una realización de la presente invención los ácidos nucleicos que contienen más de 1000 pares de bases, o 1000 nucleótidos cuando se desnaturalizan, se retiran de la muestra antes de la detección. En una realización específica de la presente invención, las muestras de orina se filtran antes de la amplificación por PCR para retirar sustancialmente todo el ADN que comprende más de 300 pares de bases, o 300 nucleótidos cuando se desnaturaliza. Sin limitar la invención a un mecanismo específico, se propone que una filtración tal retira el ADN contaminante de las células vertidas desde la pared de la uretra/vejiga o introducidas en la uretra durante las relaciones sexuales. La mayoría del ADN de tales fuentes contaminantes parece comprender nucleótidos de más de 300 pb ya que el ADN no es para la mayor parte un producto de fragmentación de ácidos nucleicos como resultado de la muerte celular apoptótica. Las moléculas de ácido nucleico también pueden aislarse por electroforesis en gel, por la que los fragmentos de ácido nucleico se separan de acuerdo con el peso molecular. La técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), aplica los métodos de la separación por electroforesis, seguido de la detección de ácidos nucleicos permitiendo la comparación por peso molecular de fragmentos de dos más alelos de una secuencia génica específica.

Los métodos de purificación anteriormente mencionados se entienden que describen, pero no limitan, los métodos

adecuados para usar en la invención. Los métodos para aislar ácidos nucleicos están dentro de la capacidad de un experto en la materia y no se describen con detalle en el presente documento.

La presente invención abarca además métodos que tienen la etapa de reducir la degradación del ADN en dicha muestra de orina, que en una realización abarca el tratamiento con un compuesto seleccionado del grupo que comprende: ácido etilendiaminotetraacético, HCl de guanidina, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina y dodecilsulfato Na. La degradación de ADN puede reducirse además tomando una muestra de orina que se ha mantenido en la vejiga menos de 12 horas. En una realización, es beneficioso aislar sustancialmente dicha secuencia de ácidos nucleicos antes de ensayar la orina para la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos del VPH, que ha cruzado la barrera del riñón. En realizaciones alternativas, la secuencia de ácido nucleico se aísla sustancialmente por precipitación o por tratamiento con un material adsorbente sólido. En otra realización, la muestra de orina se filtra para retirar los contaminantes y, en una realización específica, el filtrado retira el ADN que comprende más de aproximadamente 1000 nucleótidos. Preferentemente, el filtrado retira el ADN que comprende más de 300 nucleótidos.

Los términos “detectar” y “analizar” en relación a la secuencia de ácidos nucleicos, se refieren al uso de cualquier método para observar, averiguar o cuantificar señales que indiquen la presencia de la secuencia diana de ácidos nucleicos en una muestra o la cantidad absoluta o relativa de la secuencia de ácidos nucleicos en una muestra. Los métodos pueden combinarse con métodos de marcaje de ácidos nucleicos para proporcionar una señal, por ejemplo, por fluorescencia, radiactividad, colorimetría, gravimetría, difracción de rayos X o adsorción, magnetismo, actividad enzimática y similares. La señal puede detectarse y/o cuantificarse después, por métodos apropiados para el tipo de señal, para determinar la presencia o la ausencia, o la secuencia de ADN específica de interés.

“Cuantificar” en relación a una secuencia de ácidos nucleicos, se refiere al uso de cualquier método para estudiar la cantidad de una secuencia particular de ácidos nucleicos, incluyendo, sin limitación, métodos para determinar el número de copias de una secuencia de ácidos nucleicos o para determinar el cambio en la cantidad de copias de la secuencia de ácidos nucleicos con el tiempo, o para determinar la concentración relativa de una secuencia cuando se compara con otra secuencia.

Para ayudar en la detección y el análisis, las secuencias específicas de ADN pueden “amplificarse” en un número de maneras, incluyendo, pero no limitado a reacción de sonda en ciclo (Bekkaoui, F. et al, BioTechniques 20,240-248 (1996), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR-SSCP (polimorfismo de conformación de hebra sencilla), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (F. Barany Proc. Natl. Acad. Sci USA 88:189-93 (1991)), clonación, amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) (G. K. Terrance Walker et al., Nucleic Acids Res. 22:2670-77 (1994) y variaciones tales como amplificación específica de alelos (ASA).

Para facilitar el entendimiento de la invención, se define a continuación un número de términos.

El término “gen” se refiere a una secuencia de ADN que comprende secuencias control y codificantes necesarias para la transcripción de la secuencia de ARN. El término “genoma” se refiere al complemento génico completo de un organismo, contenido en un conjunto de cromosomas en eucariotas.

Un gen o una secuencia génica “tipo silvestre” es aquella que se observa más frecuentemente en una población y de esta manera se designa arbitrariamente la forma “normal” o “tipo silvestre” del gen. En contraste, los términos “modificado”, “mutante”, “anomalía” o “alterado” se refiere a un gen, una secuencia o un producto génico que muestra modificaciones en la secuencia y/o en las propiedades funcionales (es decir, características alteradas) cuando se compara con el gen, la secuencia o el producto génico de tipo silvestre. Nótese que los mutantes de origen natural pueden aislarse; estos se identifican por el hecho de que tienen características alteradas cuando se comparan con el gen o el producto génico de tipo silvestre. Sin limitar la invención a la detección de cualquier tipo específico de anomalía, las mutaciones pueden tomar muchas formas, incluyendo adición, adición-delección, desplazamiento de marco, cambio de sentido, punto, desplazamiento de marco de lectura, mutaciones reversas, de transición y de transversión así como alteraciones de los microsatélites.

Los términos “oligonucleótido” y “polinucleótido” y ácido nucleico “polimérico” son intercambiables y se definen como una molécula comprendida por dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, preferentemente más de tres y normalmente más de diez. El tamaño exacto dependerá de muchos factores, que a su vez dependen de la función o el uso últimos del oligonucleótido. El oligonucleótido puede generarse de cualquier manera, incluyendo síntesis química, replicación de ADN, transcripción inversa o una combinación de los mismos.

Debido a que los mononucleótidos se hacen reaccionar para fabricar oligonucleótidos de una manera tal que el fosfato 5' de un anillo de pentosa de mononucleótido se une al oxígeno 3' de su vecino en una dirección a través de un enlace fosfodiéster, un extremo de un oligonucleótido se denomina el “extremo 5'” si su fosfato 5' no está unido al oxígeno 3' de un anillo de pentosa de mononucleótido y como el “extremo 3'” si su oxígeno 3' no está unido a un fosfato 5' de un anillo de pentosa de mononucleótido posterior. Como se usa en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico, incluso si es interna en un oligonucleótido más largo, también puede decirse que tenga extremos 5' y 3'.

Cuando dos oligonucleótidos diferentes que no se superponen hibridan en diferentes regiones de la misma secuencia complementaria lineal de ácidos nucleicos y el extremo 3' de un oligonucleótido apunta hacia el extremo 5' del otro, el primero puede llamarse el oligonucleótido "aguas arriba" y el último el oligonucleótido "aguas abajo".

5 El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis cuando se coloca en condiciones donde se inicia la extensión del cebador. Un "cebador" de oligonucleótido puede ser de origen natural, como en una digestión de restricción purificada o puede producirse sintéticamente.

10 Un cebador se selecciona para ser "sustancialmente" complementario a una hebra de una secuencia específica del molde. Un cebador debe ser suficientemente complementario para hibridar con una hebra molde para que ocurra la elongación del cebador. Una secuencia cebadora no necesita reflejar la secuencia exacta del molde. Por ejemplo, un fragmento de nucleótido no complementario puede unirse al extremo 5' del cebador, siendo lo que queda de la secuencia del cebador sustancialmente complementaria a la hebra. Las bases no complementarias o secuencias
15 más largas pueden intercalarse en el cebador, con la condición de que la secuencia del cebador tenga suficiente complementariedad con la secuencia del molde para hibridar y de esta manera formar un complejo cebador molde para la síntesis del producto de extensión del cebador.

20 Un ácido nucleico "diana" es una secuencia de ácidos nucleicos a evaluar por hibridación, amplificación o cualquier otro medio de analizar una secuencia de ácido nucleico, incluyendo una combinación de métodos de análisis.

25 Los métodos de "hibridación" implican la hibridación de una secuencia complementaria al ácido nucleico diana (la secuencia a analizarse). La capacidad de dos polímeros de ácido nucleico que contienen secuencias complementarias para encontrarse el uno al otro e hibridarse a través de interacciones por apareamiento de bases es un fenómeno bien reconocido. Las observaciones iniciales del proceso de "hibridación" por Marmur y Lane, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 46:453 (1960) y Doty et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 46:461 (1960) se han seguido por el refinamiento de este proceso en una herramienta esencial de la biología moderna. La hibridación abarca, pero no se limita a, técnicas de hibridación de ranura, de punto y de transferencia.

30 Es importante para algunas aplicaciones de diagnóstico determinar si la hibridación representa complementariedad completa o parcial. Por ejemplo, donde se desea detectar simplemente la presencia o la ausencia de ADN patógeno (tal como de un virus, de bacteria, de hongo, de micoplasma, de protozoo) solamente es importante que el método de hibridación asegure la hibridación cuando la secuencia relevante está presente; las condiciones pueden seleccionarse donde ambas sondas parcialmente complementarias y las sondas completamente complementarias
35 hibridarán. Otras aplicaciones diagnósticas, sin embargo, podrían requerir que el método de hibridación distinga entre la complementariedad parcial y completa. Puede ser de interés detectar polimorfismos genéticos.

40 Los métodos que permiten el mismo nivel de hibridación en el caso tanto de complementariedad parcial como completa normalmente son inadecuados para tales aplicaciones; la sonda hibridará tanto con la secuencia diana normal como con la variante. La presente invención contempla que para algunos fines diagnósticos, la hibridación se combine con otras técnicas (tales como análisis de enzimas de restricción). La hibridación, independientemente del método usado, requiere algún grado de complementariedad entre la secuencia a analizarse (la secuencia diana) y el fragmento de ADN usado para realizar el ensayo (la sonda). (Por supuesto, uno puede obtener unión sin ninguna complementariedad pero esta unión no es específica y ha de evitarse).

45 El complemento de una secuencia de ácido nucleico como se usa en el presente documento se refiere a un oligonucleótido que, cuando se hibrida con la secuencia de ácido nucleico de tal manera que el extremo 5' de una secuencia se aparea con el extremo 3' de la otra, está en "asociación antiparalela". Las bases específicas que no se encuentran comúnmente en los ácidos nucleicos naturales pueden incluirse en los ácidos nucleicos de la presente invención e incluyen, por ejemplo, inosina y 7-dezaguanina. La complementariedad no necesita ser perfecta; los
50 dúplex estables pueden contener pares de bases mal apareadas o bases sin aparear. Los expertos en la materia de la tecnología de los ácidos nucleicos pueden determinar empíricamente la estabilidad de un dúplex considerando un número de variables incluyendo, por ejemplo, la longitud del oligonucleótido, la composición de bases y la secuencia del oligonucleótido, la fuerza iónica y la incidencia de pares de bases mal apareados.

55 Como se usa en el presente documento, el término "T_m" se usa en referencia a la "temperatura de fusión". La temperatura de fusión es la temperatura a la que una población de moléculas de ácido nucleico de doble cadena se vuelve semi disociada en hebras únicas. La ecuación para calcular la T_m de los ácidos nucleicos se conoce bien en la materia. Como se indica por los patrones de referencia, puede calcularse un estimado simple del valor de T_m mediante la ecuación: $T_m = 81,5 + 0,41 (\% G+C)$, cuando un ácido nucleico está en solución acuosa en NaCl 1 M (véase, por ejemplo Anderson y Young, Quantitative Filter Hybridisation, en Nucleic Acid Hybridisation (1985)). Otras referencias incluyen computaciones más sofisticadas que toman en cuenta características estructurales así como de
60 secuencia para el cálculo de la T_m.

65 El término "sonda" como se usa en el presente documento se refiere a un oligonucleótido (es decir, una secuencia de nucleótidos), de origen natural como en una digestión de restricción purificada o producido sintéticamente, que

forma una estructura de dúplex u otro complejo con una secuencia en otro ácido nucleico, debido a la complementariedad u otros medios de interacción atractiva reproducible, de al menos una secuencia en la sonda con una secuencia en el otro ácido nucleico. Las sondas son útiles en la detección, la identificación y el aislamiento de secuencias génicas particulares. Se contempla que cualquier sonda se marcará con una "molécula indicadora", de tal manera que sea detectable en cualquier sistema de detección, incluyendo, pero no limitado a, sistemas enzimáticos (por ejemplo ELISA, así como ensayos histoquímicos basados en enzimas), fluorescentes, radiactivos y luminiscentes. Se contempla adicionalmente que el oligonucleótido de interés (es decir, a detectarse) se marcará con una molécula indicadora. También se contempla que tanto la sonda como el oligonucleótido de interés se marquen. No se pretende que la presente divulgación se limite a ningún sistema de detección o marca particulares.

El término "marca" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier átomo o molécula que puede usarse para proporcionar una señal detectable (preferentemente cuantificable) y que pueda unirse a un ácido nucleico o proteína. Las marcas proporcionan señales detectables por cualquier número de métodos, incluyendo, pero no limitados a, fluorescencia, radiactividad, colorimetría, gravimetría, difracción de rayos X o absorción, magnetismo y actividad enzimática.

La frase "sustancialmente de hebra única" cuando se usa en referencia a un ácido nucleico diana significa que la molécula diana existe principalmente como una hebra sencilla de ácido nucleico en contraste a la diana de doble hebra que existe como dos hebras de ácido nucleico que se mantienen juntas por interacciones de apareamiento de bases entre hebras.

La frase "variación de secuencias" como se usa en el presente documento se refiere a diferencias en la secuencia de ácidos nucleicos entre dos moldes de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un gen estructural tipo silvestre y una forma mutante de este gen estructural tipo silvestre puede variar en secuencia por la presencia de sustituciones de base única y/o deleciones o inserciones de uno o más nucleótidos. Estas dos formas de gen estructural se dice que varían en secuencia entre sí. Puede salir una segunda forma mutante del gen estructural. Esta segunda forma mutante se dice que varía en secuencia del gen tipo silvestre y de la primera forma mutante del gen.

Las frases "firma de sondeo de estructura", "firma de hibridación" y "perfil de hibridación" se usan intercambiabilmente en el presente documento para indicar el nivel medido de formación de complejo entre un ácido nucleico diana y una sonda o un conjunto de sondas, siendo tales niveles medidos característicos del ácido nucleico diana cuando se comparan con los niveles de la formación de complejo que implican dianas o sondas de referencia.

"Cebadores de oligonucleótidos que coinciden o son complementarios a una secuencia génica" se refiere a cebadores de oligonucleótidos capaces de facilitar la síntesis dependiente del molde de ácidos nucleicos de hebra sencilla o doble. Los cebadores de oligonucleótidos que coinciden o son complementarios a una secuencia génica pueden usarse en PCR, RT-PCR y similares.

"Secuencia de ácido nucleico" como se usa en el presente documento se refiere a un oligonucleótido, nucleótido o polinucleótido y a fragmentos o porciones de los mismos y al ADN o al ARN de origen genómico o sintético que puede ser de cadena sencilla o doble y representa la hebra sentido o la antisentido.

Una "delección" se define como un cambio bien en un nucleótido o bien en una secuencia de aminoácidos donde uno o más nucleótidos o restos de aminoácidos, respectivamente, están ausentes.

Una "inserción" o "adición" es ese cambio en un nucleótido o una secuencia de nucleótidos que ha resultado en la adición de uno o más nucleótidos o restos de aminoácidos, respectivamente, en comparación con las secuencias de origen natural.

Una "sustitución" resulta del reemplazamiento de uno o más nucleótidos o aminoácidos por diferentes nucleótidos o aminoácidos, respectivamente.

Una "modificación" en una secuencia de aminoácidos se refiere a cualquier cambio en una secuencia de ácidos nucleicos, incluyendo, pero no limitado a una delección, una adición, una adición-delección, una sustitución, una inserción, una reversión, una transversión, una mutación puntual, una alteración del microsatélite, metilación o formación de un aducto de nucleótido.

Como se usa en el presente documento, los términos "purificado", "descontaminado" y "esterilizado" se refieren a la retirada de contaminante o contaminantes de una muestra.

Como se usa en el presente documento, las frases "sustancialmente purificado" y "sustancialmente aislado" se refieren a secuencias de ácidos nucleicos que se retiran de su medio natural, se aíslan o se separan, y están preferentemente un 60 % libres, más preferentemente un 75 % libres y más preferentemente un 90 % libres de otros componentes a los que están asociados de forma natural. Un "polinucleótido aislado" es por lo tanto un polinucleótido sustancialmente purificado. Se contempla que para practicar los métodos de la presente invención los polinucleótidos pueden, pero no necesitan estar sustancialmente purificados. Se conoce en la técnica una diversidad

de métodos para la detección de secuencias de ácidos nucleicos en forma no purificada.

“Amplificación” se define como la producción de copias adicionales de una secuencia de ácidos nucleicos y se lleva a cabo generalmente usando la reacción en cadena de la polimerasa u otras tecnologías bien conocidas en la técnica (por ejemplo, Dieffenbach y Dveksler, PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. [1995]). Como se usa en el presente documento, la frase “reacción en cadena de la polimerasa” (“PCR”) se refiere al método de K. B. Mullis (Pat. de EE.UU. n.º 4.683.195 y n.º 4.683.202), que describen un método para aumentar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico sin clonación o purificación. Este proceso para amplificar la secuencia diana consiste en introducir un gran exceso de dos cebadores de oligonucleótidos a la mezcla de ADN que contiene la secuencia diana deseada, seguido de una secuencia precisa de ciclos térmicos en presencia del ADN polimerasa. Los dos cebadores son complementarios a sus respectivas hebras de la secuencia diana de doble hebra. Para efectuar la amplificación, la mezcla se desnatura y los cebadores se hibridan después a sus secuencias complementarias dentro de la molécula diana. Después de la hibridación, los cebadores se extienden con una polimerasa de tal manera que se forme un nuevo par de hebras complementarias. Las etapas de desnaturalización, hibridación de cebadores y extensión de la polimerasa pueden repetirse muchas veces (es decir, desnaturalización, hibridación y extensión constituyen un “ciclo”; puede haber numerosos “ciclos”) para obtener una alta concentración de un segmento amplificado de la secuencia diana deseada. La longitud del segmento amplificado de la secuencia diana deseada se determina por las posiciones relativas de los cebadores con respecto a los otros, y por lo tanto, esta longitud es un parámetro controlable. En virtud del aspecto repetitivo del proceso, el método se denomina la “reacción en cadena de la polimerasa” (en lo sucesivo en el presente documento “PCR”). Debido a que los segmentos amplificados deseados de la secuencia diana se vuelven las secuencias predominantes (en términos de concentración) en la mezcla, se dice que son “amplificados por PCR”.

Como se usa en el presente documento, el término “polimerasa” se refiere a cualquier enzima adecuada para usar en la amplificación de ácidos nucleicos de interés. Se entiende que el término abarca tales ADN polimerasas como el ADN polimerasa Taq obtenida de *Thermus aquaticus*, aunque otras polimerasas, pero termoestables y termolábiles también se abarcan por la presente definición.

Con la PCR, es posible amplificar una única copia de una secuencia diana específica en el ADN genómico hasta un nivel que pueda detectarse por varias metodologías diferentes (por ejemplo tinción, hibridación con una sonda marcada; incorporación de cebadores biotinilados seguido de detección por conjugados de avidina-enzima; incorporación de desoxinucleótidos trifosfato marcados con P32, tales como dCTP o dATP, en el segmento amplificado). Además del ADN genómico, cualquier secuencia de oligonucleótido puede amplificarse con el conjunto apropiado de moléculas cebadoras. En particular, los segmentos amplificados creados por el proceso de la PCR por sí misma son, en sí mismos, moldes eficaces para posteriores amplificaciones de PCR. Las secuencias diana amplificadas pueden usarse para obtener segmentos de ADN (por ejemplo, genes) para inserción en vectores recombinantes.

Como se usa en el presente documento, las frases “producto de PCR” y “producto de amplificación” se refieren a la mezcla resultante de los compuestos después de que se completan dos o más ciclos de las etapas de PCR de desnaturalización, hibridación y extensión. Estos términos abarcan el caso donde ha habido amplificación de uno o más segmentos de una o más secuencias diana.

Como se usa en el presente documento, las frases “endonucleasas de restricción” y “enzimas de restricción” se refieren a enzimas bacterianas, cada una de las cuales cortan ADN de doble cadena en o cerca de la secuencia específica de nucleótidos.

Como se usa en el presente documento, los términos “complementario” o “complementariedad” se usan en referencia a los polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por estas reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, para la secuencia “A-G-T”, es complementaria a la secuencia “T-C-A”. La complementariedad puede ser “parcial”, donde solamente alguna de las bases de los ácidos nucleicos coinciden de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases. O, puede haber complementariedad “completa” o “total” entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre las hebras de ácidos nucleicos tiene efectos significativos en la eficacia y la fuerza de hibridación entre las hebras de ácidos nucleicos. Esto es de particular importancia en las reacciones de amplificación, así como los métodos de detección que dependen de la unión entre ácidos nucleicos.

El término “homología” se refiere a un grado de complementariedad. Puede haber homología parcial u homología completa (es decir, identidad). Una secuencia parcialmente complementaria es una que inhibe al menos parcialmente que una secuencia completamente complementaria se hibride a un ácido nucleico diana se denomina usando la frase funcional “sustancialmente homóloga”. La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria a la secuencia diana puede examinarse usando un ensayo de hibridación (transferencia Southern o Northern, hibridación en solución y similares) en condiciones de baja rigurosidad. Una secuencia o una sonda sustancialmente homólogas competirán por e inhibirán la unión (es decir, la hibridación) de una completamente homóloga a una diana en condiciones de baja rigurosidad. Esto no quiere decir que las condiciones de baja rigurosidad sean tales que se permita la unión no específica; las condiciones de baja rigurosidad requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia

de unión no específica puede ensayarse mediante el uso de una segunda diana que carezca incluso de un grado parcial de complementariedad (por ejemplo, menos de aproximadamente un 30 % de identidad); en ausencia de unión no específica la sonda no se hibridará a la segunda diana no complementaria.

- 5 Pueden emplearse numerosas condiciones equivalentes que comprendan condiciones de baja o bien de alta rigurosidad; se consideran factores tales como la longitud y la naturaleza (ADN, ARN, composición de bases) de la sonda y la naturaleza de la diana (ADN, ARN, composición de bases, presente en solución o inmovilizada, etc.) y la concentración de las sales y otros componentes (por ejemplo, la presencia o la ausencia de formamida, sulfato de dextrano, polietilenglicol) y la solución de hibridación puede variarse para genera condiciones de hibridación de rigurosidad baja o bien alta diferentes de, pero equivalentes a, las condiciones listadas anteriormente. El término "hibridación" como se usa en el presente documento incluye "cualquier proceso por el que una hebra de un ácido nucleico se une a una hebra complementaria a través de apareamiento de bases" (Coombs, Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York N.Y. [1994].
- 10
- 15 La "rigurosidad" se da típicamente en un intervalo de aproximadamente $T_m - 5^\circ\text{C}$ (5°C por debajo de la T_m de la sonda) a aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de la T_m . Como se entenderá por aquellos expertos en la materia, puede usarse una hibridación rigurosa para identificar o detectar secuencias de polinucleótidos idénticas o para identificar o detectar secuencias de polinucleótidos similares o relacionadas.
- 20 Como se usa en el presente documento la frase "complejo de hibridación" se refiere a un complejo formado entre dos secuencias de ácidos nucleicos en virtud de la formación de enlaces de hidrógeno entre las bases complementarias G y C y entre las bases complementarias A y T; estos enlaces de hidrógeno pueden estabilizarse adicionalmente por interacciones de apilamiento de bases. Las dos secuencias complementarias de ácidos nucleicos se unen con hidrógeno en configuración antiparalela. Puede formarse un complejo de hibridación en solución (por ejemplo, análisis C0t o R0t) o entre una secuencia de ácido nucleico presente en solución y otra
- 25 secuencia de ácido nucleico inmovilizada en un soporte sólido (por ejemplo, una membrana de nailon o un filtro de nitrocelulosa como se emplea en la transferencia Southern o Northern, la transferencia de punto o un portaobjetos de vidrio como se emplea en la hibridación *in situ*, incluyendo FISH [hibridación de fluorescencia *in situ*]).
- 30 Como se usa en el presente documento, el término "antisentido" se usa en referencia a secuencias de ARN que son complementarias a un ARN específico (por ejemplo, ARNm) o a una secuencia de ADN. El ARN antisentido puede producirse por cualquier método, incluyendo síntesis por corte y empalme del gen o genes de interés en una orientación reversa a un promotor vírico que permite la síntesis de una hebra codificante. Una vez introducida en una célula, esta hebra transcrita se combina con el ARNm natural producido por la célula para formar dúplex. Estos
- 35 dúplex después bloquean bien la transcripción adicional del ARNm o su traducción. De esta manera, pueden generarse fenotipos mutantes. La frase "hebra antisentido" se usa en referencia a una hebra de ácido nucleico que es complementaria a la hebra "sentido". La designación (-) (es decir, "negativo") se usa a veces en referencia a la hebra antisentido, usándose la designación (+) a veces en referencia a la hebra sentido (es decir, "positiva").
- 40 El término "muestra" como se usa en el presente documento se usa en su sentido más amplio. Una muestra biológica sospechosa de contener ácido nucleico puede comprender, pero no se limita a, ADN genómico (en solución o unido a un soporte sólido tal como para el análisis de transferencia Southern), ADNc (en solución o unido a un soporte sólido) y similares.
- 45 La frase "tracto urinario" como se usa en el presente documento se refiere a los órganos y los conductos que participan en la secreción y la eliminación de orina del cuerpo.
- Las frases "ADN transrenal" y "ácido nucleico transrenal" como se usan en el presente documento se refieren a ácidos nucleicos que han cruzado la barrera del riñón. ADN transrenal como se usa en el presente documento difieren de ARNmi. Específicamente, el ADN transrenal comprende aleatoriedad en los extremos 3' y 5', que no está presente en el ARNmi.
- 50

La invención se describe adicionalmente a continuación, por medio de los ejemplos 3-4. Los otros ejemplos también ilustran la metodología útil para practicar la invención. Estos ejemplos no limitan la invención reivindicada.

55

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Purificación de ácidos nucleicos totales en orina *Preparación de orina:*

- 60 Se recolectaron especímenes de orina en recipientes, que eran capaces de guardar un volumen de al menos 100 ml.
- Antes del orinado, las copas de recolección se pre-llenaron con EDTA suficiente para lograr una concentración final de 50 mM cuando los recipientes estuvieran llenos (por ejemplo 10 ml de EDTA 0,5 M = 50 mM cuando se diluye hasta 100 ml con orina). Los especímenes de orina se almacenaron a -80°C . La orina congelada se descongeló a temperatura ambiente.
- 65

Etapas de Q-sefarosa

Para un tamaño de lote convencional de 10 ml de orina (antes de la dilución) se usaron 1,0 ml de suspensión de Q-sefarosa (almacén de Q-sefarosa: tamaño de 25 ml de GE Healthcare; 250 µl de resina).

La unión del AN urinario a la Q-sefarosa se realizó durante 30 min a temperatura ambiente (20-25 °C) con rotación en un tubo de 50 ml. La resina se recogió por centrifugación a temperatura ambiente (800-1000 x g durante 5 min) y se transfirió a una columna desechable vacía. La resina se lavó dos veces con al menos 1 ml de LiCl 0,3 M/NaOAc 10 mM (pH 5). El AN se eluyó con 750 µl de LiCl 2 M/NaOAc 10 mM.

Purificación en sílice:

El ADN eluido del AN Q-sefarosa en 750 µl de tampón se suplementó con 2,25 ml de EtOH al 95 % y se aplicó a una columna de sílice (Qiagen o equivalente). Si se usa la extensión de la columna una carga toma la mezcla entera, de lo contrario se realizan varias cargas. La columna se centrifugó durante 1 minuto en una microcentrífuga de tabla superior (Eppendorf). Alternativamente, se usó un colector de vacío.

La columna de sílice se lavó con 500 µl de LiCl 2 M en EtOH al 70 % por centrifugación a 5000 rpm durante 1 min. Seguido de dos lavados con KOAc 75 mM pH 5,0, EtOH al 80 %. Se eluyó el AN con 100 µl de Tris-HCl 1 mM (pH 8,0)/ EDTA 0,025 mM (pH 8,0).

Rutinariamente se usaron 5 µl para una reacción de PCR de 25 µl.

Ejemplo 2. Uso de cebadores de PCR específicos mapeados al gen E1 para la amplificación de genotipos individuales del VPH

Se ensayaron los cebadores, que se diseñaron para ser específicos para un único tipo de VPH de alto riesgo y mapearon en el fragmento desvelado del gen E1. Estos cebadores se listan en la Tabla 3. En la PCR, cada cebador hacia adelante se apareó con un cebador reverso correspondiente a una concentración de 500 mM. Por PCR, la concentración final de MgCl₂ fue 2 mM y la concentración final del ADN polimerasa Taq JumpStart fue 1,25 U/reacción. Los oligonucleótidos individuales que corresponden a tipos de VPH de alto riesgo se usaron como moldes a 100 copias por reacción (véase, Tabla 2. El tamaño predicho del producto de PCR fue 47 pares de bases (pb).

La amplificación se realizó de acuerdo con el siguiente programa:

1 ciclo
94 °C - 2 min (activación de la enzima)

5 ciclos
94 °C - 30 s
65 °C - 2 min

5 ciclos
94 °C - 30 s
60 °C - 1 min

35 ciclos
94 °C - 30 s
55 °C - 1 min

1 ciclo
72 °C - 5 min
4 °C - para siempre

Los productos de la reacción se presentan en la Figura 2, donde los números del carril de 1 a 13 corresponden a los siguientes genotipos de VPH de alto riesgo: 16; 18; 31; 33; 35; 39; 45; 51; 52; 56; 58; 59; 68, respectivamente. El marcador de peso molecular ("M") es una carrera de 25 pb.

Tabla 2. Oligonucleótidos individuales que corresponden a tipos de VPH de alto riesgo

SEQ ID	VPH	Secuencia de nucleótidos
1	16	CAGTGATA CAGGTGAAGATTGGTGAATTTTATAGTAAATGATATATATTTAAACACAGGCGAAGAACAGAGACAGCATGCGTGTGTTTACT GCAAGGAGCAAAACAACATAGAGATGCGATGAGGTTCTAAAJACGAAAGTAT
2	18	AACAGACACAGGGTCGGATATGGTATGATTTTATTTATGATACACAGGAAATTTTGTGAAACAGGCGAGCTTAGAGACASCACAGGCAITTTGTTCCAT GCGCAGGAGGTCCACAAATGATGACACAGTGTGTCATGTTTTTAAJACGAAAGTTTG
3	31	TAGTGATACTGGGGAGGATATGGTTGACTTTTATTTGACAAATTTGATGATACAAATCAGGCGAGAGCAGAGACAGCATGTTGTTTCAT GCAAGGAAAGCGGAGGAAACATGACAGAGCGCTGTGCGAGGTTCTAAAJACGAAAGTATG
4	33	AGATGACAGTGGCACGGATTTTACTAGAGTTTATAGATGATTTCTGTGAAAAATAGTATATACAGGCGACACAGAGGCGACCTCGGGCAITTTGTTTAAAT ATACAGGAAAGGGAGGATGATTTTAAATGCTGTGTGTGCACTAAAJACGAAAGTTTG
5	35	CTGTGACAGGGGGAGGATATGGTGGACTTTTATATAATGATACAGATATATTTAAACATACAGGCGAAGAACAGAGACAGCATTTTTCAT GCAAGGAGGAGCAAAACACACAAAGAGGCTGTACAGGTCCTTAJACGAAAGTATG
6	39	AACAGATACAGGTTTCAGACCTGGCAGACTTTTATTTGATGATTTCCACAGATATTTGTGTACAGGCGAGGCGTGTAGACAGCATCTTTTTCAT ATGCAAGAGGCCCAAAGGGATGACACAGCAGTGTGCTGCTTAAAJACGAAAGTATA
7	45	AACAGATACAGGTTTCAGATATGGTATGATTTTATTTGACACACAAATTTCCATTTGTGTGAAACAGGCGAGGCGAGAGACAGCATGTTGTTCCAT GCGCAGGAAAGTTTCAGAAATGATGACACAGGTTGTGCACTTTTAAAJACGAAAGTTTG
8	51	AGATGATACAGGATCTGATTTTAAATAACTTTATATAGATGATGTAAGTAACTGATTTTGTGACGCGGAAACAGAGACAGCATCGGGCGTTGTTTCAG GCCCAAGATTTACAGGCGAACAAGAGGCTGTGTCATCAGTTTAAAJACGAAAGTTTC
9	52	ATATGATAGTGGAAACAGATCTTAATGATTTTATAGATGATTTCAJATATAAAATATGAAACAGGCGAGAACATGAGGCACTTTGTTTAAAT GCAAGGAAAGGGGAGGATGATTTTACATGCTGTGTGTGCTGAGTAAAJACGAAAGTTTA
10	56	GGATGAAATAGATACAGATTTTATAGATGATTTTATAGACGATTTTATATACAAATATACAGGCGAGCGCAGAGAAACATCTCAATTTGTTGCAAG TACAAAACAGCATGCGATATAACAGACGTTTGCAGAACTTAAAJACGAAAGTATA
11	58	AGACGATAGTGGTACAGATTTTATAGATGATTTTATAGATGATTTTACAAAGTACTATACAGGCGAAGCAGAGGCGAGCGGCGTTGTTTAAAT GTAACAGGAAAGGGTGGACGATATAAATGCTGTGTGTGCACTTAJACGAAAGTTTG
12	59	AACAGATACAGGTTTCAGACTTGGTATGATTTTATTTGATGATACCAACAAATTTGTGTACAGGCGAGGCGCGAGACAGCATGCGGCTTTGTTTAAAT GTGCGGAAAGCCCAAAGGGATGACCGGGAATGCAATGTTTTTAAAJACGAAAGTTTG
13	68	AAATGATACAGGTTCTGATATATAAGACTTTTATAGATGATTAACAGATATTTGTCAGTCAAGAACAGAGACAGCATGCGGGCGTTGTTTCAG GTCCAGAAACACAGGCGACAAAGAGGCTGACAGCATCTTAJACGAAAGTTTG
14	6	GGTGGAGGACAGTGGGTATGACATGGTGGACTTTTATTTGATGACAGGCGATTTTACACAAAATTTCTGTGGAAGCAACAGGCAITTTTAAATAGGCGAG GAGGCGGACACCCATTATGCGACTGTGCGAGGACCTTAJACGAAAGTAT
15	11	GGTGGAGGACAGTGGGTATGACATGGTGGACTTTTATTTGATGACAGGCGATTTTACACAAAATTTCTGTGGAAGCAACAGGCAITTTTAAATAGGCGAG GAGGCGGATGCTCATTTATGCGACTGTGCGAGGACCTTAJACGAAAGTAT

Tabla 3

SEQ ID	VPH	Tipo de cebador	Secuencia
16	16	Hacia delante	CAGGCAGAAACAGAGACAG
17	18	Hacia delante	CAGGCAGAGCTAGAGACAG
18	31	Hacia delante	CAGGCAGAAGCAGAGACAG
19	33	Hacia delante	CAGGCAGACACAGAGGCAG
20	39	Hacia delante	CAGGCAGAGCGTGAGACAG
21	45	Hacia delante	CAGGCAGAGCAAGAGACAG
22	51	Hacia delante	CAGGCGGAACAGGAGACAG
23	52	Hacia delante	CAGGCAGAACATGAGGCAG
24	56	Hacia delante	CAGGCAGACGCAGAAACAG
25	58	Hacia delante	CAGGCAGAAGCAGAGGCAG
26	59	Hacia delante	CAGGCAGAGCGCGAGACAG
27	68	Hacia delante	CAGGCGGAACAAGAGACAG
28	16	Reverso	TGCTTCCTGTGCAGTAAACAACG
29	18	Reverso	GACCTCCTGCGCATGGAACAATG
30	31	Reverso	CGCTTCCTGTGCATGAAACAATG
31	33	Reverso	CCCTTCCTGTATATTAAACAATG
32	35	Reverso	CTCCTCCTGTGCATGAAATAATG
33	39	Reverso	GGCCTCTTGCATATGTAAAAGTAC
34	45	Reverso	AACTTCCTGCGCATGGAACAATG
35	51	Reverso	TAATTCTTGGGCCTGAAACAACG
36	52	Reverso	CCCTTCCTGTGCATTAAACAATG
37	56	Reverso	TGCTGTTTGTACTTGCAACAATTG
38	58	Reverso	CCCTTCCTGTACATTAAACAACG
39	59	Reverso	GGCTTCCTGCACATTAAACAAGG
40	68	Reverso	TGTTTCTTGGACCTGAAACAACG

Ejemplo 3: Uso de un único par de cebadores de PCR para la detección de los 13 genotipos de VPH de alto riesgo

- 5 El fin de este experimento fue usar un único par de cebadores mapeados en el fragmento de interés del gen E1 del VPH para la detección específica de todos o la mayoría de las 13 cepas de VPH de alto riesgo que no reaccionaron con contrapartes de bajo riesgo. Se usó SEQ ID 41: 5'-CAGGCAGAATTAGAGRCAGC-3' como el cebador hacia delante y se usó SEQ ID 42: 5'-tccaccacaWACTTTTCGTTTTA-3' como el cebador reverso. Los nucleótidos en minúscula en el cebador reverso son la cola seleccionada aleatoriamente para ajustar la temperatura de fusión (T_m) del cebador.

15 El tamaño esperado del producto específico fue 97 pb. En la PCR, el cebador hacia delante se apareó con el cebador reverso a una concentración de 800 nM. En esta reacción, la concentración final de MgCl₂ fue 3 mM y la concentración final del ADN polimerasa Taq JumpStart fue 1,25 U/reacción. Los oligonucleótidos que correspondían a tipos de VPH de alto y bajo riesgo se usaron como los moldes a 1000 copias por reacción (véase, Tabla 2).

La amplificación se realizó de acuerdo con el siguiente programa:

20 1 ciclo
94 °C - 2 min (activación de la enzima)

40 ciclos
94 °C - 30 s
50 °C - 30 s
25 72 °C - 30 s

1 ciclo
72 °C - 5 min
4 °C - para siempre

Los productos de la reacción se presentan en la Figura 3, donde los números del carril de 1 a 13 corresponden a los siguientes genotipos de VPH de alto riesgo: 16; 18; 31; 33; 35; 39; 45; 51; 52; 56; 58; 59; 68, respectivamente y los carriles 14 y 15 corresponden a los genotipos de bajo riesgo 6 y 11, respectivamente. El marcador de peso molecular ("M") es una carrera de 25 pb.

Ejemplo 4: Uso de un único par de cebadores de PCR para analizar muestras de orina de pacientes con cáncer cervical

Se usó un único par de cebadores que mapeaban en el fragmento de interés del gen E1 del VPH para la detección específica de ADN de genotipos de alto riesgo del VPH. Específicamente, se usó SEQ ID 41: 5'-CAGGCAGAATTAGAGRCAGC-3' como el cebador hacia delante y se usó SEQ ID 42: 5'-tccaccacaWACTTTTCGTTT-3' como el cebador reverso. Los nucleótidos en minúscula en el cebador reverso son la cola seleccionada aleatoriamente para ajustar la temperatura de fusión (Tm) del cebador. En la PCR, el cebador hacia delante se apareó con el cebador reverso a una concentración de 800 nM. En esta reacción, la concentración final de MgCl₂ fue 3 mM y la concentración final del ADN polimerasa Taq JumpStart fue 1,25 U/reacción.

El ADN de las muestras de orina se extrajo de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Se pidió a los pacientes que donaran dos muestras de orina: una primera muestra que se auto-recogió por la mañana y una segunda muestra que se recogió en la consulta del doctor más tarde el mismo día (dentro de un periodo de 24 horas). Las muestras cervicales se tomaron para los ensayos de Digene. Se extrajo el ADN de 10 ml de orina en 100 µl de tampón de elución, del que 5 µl se usaron para la PCR.

La amplificación se realizó de acuerdo con el siguiente programa:

1 ciclo
94 °C - 2 min (activación de la enzima)

40 ciclos
94 °C - 30 s
50 °C - 30 s
72 °C - 30 s

1 ciclo
72 °C - 5 min
4 °C - para siempre

Los productos de la reacción se presentan en la Figura 4, donde los números del carril de 1 a 18 representan las muestras de orina de los pacientes con cáncer de cérvix. Los números de carril impares representan las muestras de orina auto-recogidas por la mañana, mientras que los números pares del carril representan las muestras de orina donadas por los pacientes en la consulta del doctor más tarde el mismo día. Específicamente, el carril 19 contenía una muestra de orina de un voluntario sano. El carril 20 contenía agua como un control para la purificación de ADN de la orina. El carril 21 contenía ADN genómico de VPH 16 como control positivo. El carril 22 contenía ADN genómico humano (equivalente a 20.000 genoma). El carril 23 contenía una mezcla equívoca de moldes de HPV 6 y 11 de bajo riesgo. Y el carril 24 era una reacción control que no contenía oligonucleótido ni molde de ADN.

Ejemplo 5: Uso de todos los pares de cebadores de PCR específicos de VPH de alto riesgo en una PCR de tubo único para la detección del virus:

Los moldes de oligonucleótido que representan genotipos de alto riesgo (véase, Tabla 2) se amplificaron por PCR con la mezcla de todos los pares de cebadores específicos de alto riesgo. En cada reacción, se incluyó un total de 25 cebadores de PCR (véase, Tabla 4). En la PCR, los cebadores hacia delante, cada uno usado a una concentración de 200 nM, se combinó cada uno con los cebadores reversos, cada uno usado a una concentración de 300 nM. En esta reacción, la concentración final de MgCl₂ fue 2 mM y la concentración final del ADN polimerasa AmpliTaq fue 1,25 U/reacción. Los oligonucleótidos que correspondían a tipos de VPH de alto y bajo riesgo se usaron como los moldes a 1000 copias por reacción (Tabla 3)

La amplificación se realizó de acuerdo con el siguiente programa:

1 ciclo
94 °C - 10 min (activación de la enzima)

40 ciclos
94 °C - 30 s
50 °C - 30 s
72 °C - 30 s

1 ciclo
72 °C - 5 min
4 °C - para siempre

5

El tamaño esperado del producto específico fue 62 pb. La huella dactilar de la diana eran 51 pb. Los resultados se representan en la Figura 5, donde los números del carril de 1 a 13 corresponden a los siguientes genotipos de VPH de alto riesgo: 16; 18; 31; 33; 35; 39; 45; 51; 52; 56; 58; 59; 68, respectivamente y los carriles 15 y 16 corresponden a los genotipos de bajo riesgo 6 y 11, respectivamente. El marcador de peso molecular ("M") es una carrera de 25 pb.

10

Tabla 4

SEQ ID	VPH	Tipo de cebador	Secuencia
43	16	Hacia delante	caactccatctACACAGGCAGAAACAGAGACAG
44	18	Hacia delante	caactccatctGAACAGGCAGAGCTAGAGACAG
45	31	Hacia delante	caactccatctAATCAGGCAGAAGCAGAGACAG
46	33	Hacia delante	caactccatctATACAGGCAGACACAGAGGCAG
47	35	Hacia delante	caactccatctATACAGGCAGAAACAGAGACAG
48	39	Hacia delante	caactccatctGTACAGGCAGAGCGTGAGACAG
49	45	Hacia delante	caactccatctGAACAGGCAGAGCAAGAGACAG
50	52	Hacia delante	caactccatctGAACAGGCAGAACATGAGGCAG
51	56	Hacia delante	caactccatctATACAGGCAGACGCAGAAACAG
52	58	Hacia delante	caactccatctACACAGGCAGAAGCAGAGGCAG
53	59	Hacia delante	caactccatctGTACAGGCAGAGCGCGAGACAG
54	68	Hacia delante	caactccatctAGTCAGGCGGAACAAGAGACAG
55	16	Reverso	TGCTTCCTGTGCAGTAAACAACGCATG
56	18	Reverso	GACCTCCTGCGCATGGAACAATGC
30	31	Reverso	CGCTTCCTGTGCATGAAACAATG
57	33	Reverso	CCCTTCCTGTATATTAAACAATGCC
58	35	Reverso	CTCCTCCTGTGCATGAAATAATGCTTG
33	39	Reverso	GGCCTCTTG CATATGTAAAAGTAC
34	45	Reverso	AACCTTCCTGCGCATGGAACAATG
35	51	Reverso	TAATTCTTGGGCCTGAAACAACG
36	52	Reverso	CCCTTCCTGTGCATTAAACAATG
59	56	Reverso	GTGCTGTTTGTACTTGCAACAATTG
38	58	Reverso	CCCTTCCTGTACATTAAACAACG
39	59	Reverso	GGCTTCCTGCACATTAAACAAGG
40	68	Reverso	TGTTTCTTGGACCTGAAACAACG

Ejemplo 6: Uso de todos los pares de cebadores de PCR específicos de VPH de alto riesgo en una PCR de tubo único para la detección del virus:

15

Las muestras de orina de pacientes con cáncer cervical se ensayaron usando una mezcla de todos los pares de cebadores específicos de alto riesgo. Por lo tanto, la PCR contenía un total de 25 cebadores de PCR (véase, Tabla 4). En la PCR, los cebadores hacia delante, cada uno usado a una concentración de 200 nM, se combinó cada uno con los cebadores reversos, cada uno usado a una concentración de 300 nM. En esta reacción, la concentración final de MgCl₂ fue 2 mM y la concentración final del ADN polimerasa AmpliTaq fue 1,25 U/reacción. El ADN de las muestras de orina se extrajo de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Se usaron las muestras de orina recogidas en la visita a la consulta del doctor (véase el Ejemplo 5). El ADN de 10 ml de orina se extrajo en 100 µl de tampón de elución, de los cuales 5 µl se usaron para PCR.

20

25

La amplificación se realizó de acuerdo con el siguiente programa:

1 ciclo
94 °C - 10 min (activación de la enzima)

40 ciclos
 94 °C - 30 s
 50 °C - 30 s
 72 °C - 30 s
 1 ciclo
 72 °C - 5 min
 4 °C - para siempre

El tamaño esperado del producto específico fue 62 pb. Los resultados se representan en la Figura 6, donde los números del carril de 1 a 10 son la orina de los pacientes con cáncer de cérvix. Específicamente, el carril 11 contenía ADN genómico humano (equivalente a 20.000 genoma). El carril 12 contenía ADN genómico de VPH 18 como control positivo. El carril 24 era una reacción control que no contenía oligonucleótido ni molde de ADN.

Ejemplo 7: Uso de un subconjunto de pares de cebadores específicos de VPH de alto riesgo en una PCR de tubo único para la detección del virus:

Los oligonucleótidos que representan genotipos de alto riesgo de VPH (Tabla 3) se amplificaron por PCR usando un subconjunto de PH de alto riesgo, los cebadores hacia delante, cada uno usado a una concentración de 200 nM, se combinó cada uno con los cebadores reversos, cada uno usado a una concentración de 300 nM. En esta reacción se usó un total de 20 cebadores (Tabla 5). En esta reacción, la concentración final de MgCl₂ fue 2 mM y la concentración final del ADN polimerasa AmpliTaq fue 1,25 U/reacción. Los oligonucleótidos individuales que correspondían a tipos de VPH de alto y bajo riesgo se usaron como los moldes a 1000 copias por reacción (Tabla 2).

La amplificación se realizó de acuerdo con el siguiente programa:

1 ciclo
 94 °C - 10 min (activación de la enzima)
 40 ciclos
 94 °C - 30 s
 62 °C - 30 s
 1 ciclo
 72 °C - 2 min
 4 °C - para siempre

El tamaño esperado del producto específico fue 62 pb. La huella dactilar de la diana eran 51 pb. Los resultados se representan en la Figura 7, donde los números del carril de 1 a 13 corresponden a los siguientes genotipos de VPH de alto riesgo: 16; 18; 31; 33; 35; 39; 45; 51; 52; 56; 58; 59; 68, respectivamente y los carriles 15 y 16 corresponden a los genotipos de bajo riesgo 6 y 11, respectivamente. El marcador de peso molecular ("M") es una carrera de 25 pb.

Tabla 5

SEQ ID	VPH	Tipo de cebador	Secuencia
43	16	Hacia delante	caactccatctACACAGGCAGAAACAGAGACAG
44	18	Hacia delante	caactccatctGAACAGGCAGAGCTAGAGACAG
46	33	Hacia delante	caactccatctATACAGGCAGACACAGAGGCAG
48	39	Hacia delante	caactccatctGTACAGGCAGAGCGTGAGACAG
49	45	Hacia delante	caactccatctGAACAGGCAGAGCAAGAGACAG
50	52	Hacia delante	caactccatctGAACAGGCAGAACATGAGGCAG
51	56	Hacia delante	caactccatctATACAGGCAGACGCAGAAACAG
52	58	Hacia delante	caactccatctACACAGGCAGAAAGCAGAGGCAG
54	68	Hacia delante	caactccatctAGTCAGGCGGAACAAGAGACAG
55	16	Reverso	TGCTTCCTGTGCAGTAAACAACGCATG
56	18	Reverso	GACCTCCTGCGCATGGAACAATGC
30	31	Reverso	CGCTTCCTGTGCATGAAACAATG
57	33	Reverso	CCCTTCCTGTATATTAACAATGCC
58	35	Reverso	CTCCTCCTGTGCATGAAATAATGCTTG
33	39	Reverso	GGCCTCTTGCATATGTAAAAGTAC
35	51	Reverso	TAATTCTTGGGCCTGAAACAACG

36	52	Reverso	CCCTTCCTGTGCATTAAACAATG
59	56	Reverso	GTGCTGTTTGTACTTGCAACAATTG
38	58	Reverso	CCCTTCCTGTACATTAAACAACG
39	59	Reverso	GGCTTCCTGCACATTAAACAAGG

Ejemplo 8: Un ensayo de barrido molecular mejorado para la detección del VPH de alto riesgo en la orina de poblaciones de alto y bajo riesgo en La India

5 La tecnología de ARN Transrenal (ADN-Tr) Xenomics está basada en fragmentos de ADN de células que mueren a lo largo de todo el cuerpo. Este ADN aparece en el torrente sanguíneo y se excreta en la orina. El análisis de las muestras de orina se aplicó a la detección de secuencias de ADN específicas del cromosoma Y de mujeres con fetos masculinos, mutantes de K-ras en pacientes de cáncer colorectal y *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes con tuberculosis pulmonar.

10 El ensayo de ADN de VPH usado en este estudio implica el aislamiento del ADN de la orina y la amplificación específica de la región E1 del VPH para detectar la presencia de tipos de VPH de alto riesgo que se han asociado a cáncer cervical. Estos tipos de alto riesgo incluyen VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68. El ADN se amplifica por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando un cebador hacia delante marcado con FAM y
15 un cebador reverso sin marcar. Estos cebadores generaron un amplicón de 93-96 pares de bases (pb) como se determinó por electroforesis capilar (CE). No se observó reactividad cruzada con los tipos 6 y 11 de VPH de bajo riesgo. Los datos obtenidos demostraron que la sensibilidad y la especificidad de este ensayo eran equivalentes a o mejores que aquellos de un ensayo actual en uso clínico basado en el raspado cervical.

20 **Métodos**

Recogida de muestras

25 Las muestras se recogieron de poblaciones en La India de alto y bajo riesgo incluyendo aquellas de pacientes de etapas del cáncer por Simbiosys Biowares Inc. Y Metropolis Inc. Los sujetos de alto riesgo se reclutaron bien desde clínicas de STD en hospitales o distintos burdeles de Bengala Occidental en el este de La India. Específicamente, se usaron 270 muestras pre-exploradas de esta población en este estudio; 51 de las 270 muestras (18,9 %) se sabía que eran negativas por el ensayo de QIAGEN hc2. Cincuenta sujetos de bajo riesgo sin predisposición a la enfermedad se reclutaron de un campo de salud en Mumbai. Se obtuvieron cincuenta muestras de orina de mujeres
30 embarazadas de una población general en La India. Los especímenes citológicos y las muestras de orina se obtuvieron de acuerdo con el protocolo revisado por comités éticos independientes incluyendo el Indian Council of Medical Research y que informaron del consentimiento de los sujetos. La orina se recogió en copas de recolección disponibles en el mercado. Las muestras de orina se llevaron a al menos 50 mM de EDTA, se transportaron en hielo seco y se almacenaron a -80 °C hasta el uso adicional.

35 *Frotis Pap y ensayo hc2*

Se realizaron frotis Pap y ensayos hc2 por Simbiosys Biowares Inc. Y Metropolis Inc. Una porción de la muestra cervical recogida se usó inmediatamente para hacer un frotis para el ensayo Pap y el resto se transfirió a una
40 solución tampón para el ensayo de VPH por QIAGEN h2c. Los ensayos h2c se realizaron y se analizaron como por las instrucciones del fabricante usando el cóctel de Sonda de VPH HR. El umbral de positividad recomendado de 1 pg/ml se usó como corte y todas las muestras con una relación unidades de luz relativas/control (RLU/CO) de 1,00 o mayor se consideraron positivas.

45 *Aislamiento de ADN*

Las muestras de orina almacenadas a -80 °C se descongelaron y se mezclaron por inversión cuidadosa. Se llevó a cabo el aislamiento del ADN por el protocolo descrito previamente (Shekhtman E. M. et al. Clin Chem 2009; 55:723-729). Brevemente se incubó una muestra de orina:agua 1:1 con suspensión de resina Q-sefarosa (GE Healthcare, Piscataway, NJ). La resina se sedimentó y el sobrenadante se descartó. La resina sedimentada se resuspendió y se transfirió a una columna de giro. El tampón de resuspensión se retiró y la resina se lavó. El ADN eluyó de la resina mediante LiCl 2 M- El eluato se llevó a etanol al 70 % y se aplicó a una columna QIAquick (QIAGEN, Hilden, Alemania). La columna se lavó con LiCl 2 M/EtOH al 70 % seguido de KOAc 75 mM (pH 5,0)/ EtOH al 80 %. El ADN eluyó con tampón EB (QIAGEN, Hilden, Alemania) y se almacenó a -20 °C. Las muestras de ADN aislado se
55 cuantificaron por el ensayo Picogreen (Life Technologies).

PCR y Detección

60 Se usaron los cebadores XEN-HPV-FAM-F y XEN-HPV-R (Tabla 6) en ensayos de la PCR. Después de un tratamiento de 10 min con AmpErase® UNG (Life Technologies), se llevaron a cabo amplificaciones durante 40

ciclos en 25 µl con 600 nM cada cebador, MgCl₂ 3 mM, 1,25 Unidades de ADN Polimerasa AmpliTaq Gold (Life Technologies), 200 µM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP; y 400 µM de dUTP. Cada ciclo fue de 15 segundos (s) a 95°C y 60 s a 50 °C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis capilar por GENEWIZ (South Plainfield, NJ)

Secuenciación de ADN

Las amplificaciones de PCR se realizaron usando diferentes conjuntos de cebadores (Tabla 6) con ADN polimerasa JumpStart™ Taq (Sigma-Aldrich) y diversas concentraciones de MgCl₂ (2 mM para MY09/MY11 y GP5+/GP6+, 3 mM para XEN-HPV-F/-R). Las mezclas de reacción se sometieron a diversas etapas cíclicas para cada par de cebadores: 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 20 segundos, 37 ciclos de amplificación (MY09/MY11); 95 °C durante 15 segundos, 40 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 10 segundos, 50 ciclos de amplificación (GP5+/GP6+); 95 °C durante 15 segundos, 50 °C durante 60 segundos, 45 ciclos de amplificación (XEN-HPV-F/-R). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 % (Bio-Rad). Se cortaron rebanadas de gel y se purificaron de acuerdo con las instrucciones del kit de Extracción de Gel QIAEX II (QIAGEN) y se secuenciaron con uno de los cebadores usados para la amplificación de PCR. Se realizó la secuenciación de ADN por GENEWIZ Inc. (South Plainfield, Nueva Jersey). Las secuencias de producto de PCR sin tratar se analizaron por el algoritmo de NCBI Blastn para unir cepas específicas del virus del papiloma humano.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando métodos de tablas de contingencia convencionales (Excel 2003, Microsoft Corp.). Para caracterizar la utilidad del presente método, los presentes inventores calcularon su concordancia con el ensayo de hc2 y/o con la sensibilidad y la especificidad de la secuenciación y del diagnóstico, así como los valores predictivos positivos y negativos (PPV y NPV) (Altman, D.G. and Bland, J.M. BMJ 1994; 309:102). El 95 % del intervalo de confianza se calculó por JavaStat para cada uno de los parámetros anteriores. Se evaluó la homogeneidad entre los métodos de análisis a compararse por el test de McNemar (χ^2). Los p valores < 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. El acuerdo entre los ensayos se evaluó usando el estadístico kappa de Cohens (K). Los valores de K entre 0,4-0,6 se consideraron que tenían acuerdo moderado y los valores de 0,61-0,8 se consideraron que tenían acuerdo considerable (Landis, JR; Koch, GG. Biometrics. 1977; 33:159-174. doi: 10.2307/2529310).

Tabla 6

Cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
XEN-HPV-FAM-F	5'-FAM-CAG GCA GAA TTA GAG RCA GC-3'	97
XEN-HPV-F	5'-CAG GCA GAA TTA GAG RCA GC-3'	98
EN-HPV-R	5'-TCC ACC ACA WAC TTT CGT TTT A-3'	99
MY09	5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3'	100
MY11	5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3'	101
GP5+	5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3'	102
GP6+	5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'	103

Resultados

Se analizó un total de 320 muestras de orina por el ensayo CE de Xenomics para la comparación con los resultados del espécimen cervical correspondiente del ensayo hc2 y el ensayo Pap. Los resultados de la comparación con hc2 se muestran en la Tabla 7. La concordancia fue 248/320 (77,5 %). De las 320 muestras de orina, 72 dieron resultados discordantes con el ensayo hc2 de espécimen cervical correspondiente y se examinaron adicionalmente por secuenciación de ADN.

Secuenciación de ADN de discordantes.

La amplificación alternativa y la secuenciación se intentaron en primer lugar usando los cebadores MY09/MY11 que produjeron un producto de aproximadamente 450 pb. Si no se hubiera podido obtener o secuenciar producto de VPH de alto riesgo, entonces se intentaría la secuenciación usando los cebadores GP5+/GP6+ para generar un fragmento de aproximadamente 150 pb. Ambos de esos pares de cebadores examinan la región L1 de VPH, un sitio independiente del usado para la detección de VPH por el ensayo CE. En los casos donde los cebadores MY09/MY11 o GP5+/GP6+ generaron solamente secuencias de VPH de bajo riesgo o no generaran producto específico, se usaron los cebadores XEN-HPV-F/-R para amplificar una huella dactilar de 88 pb del gen E2 que pudiera proporcionar evidencias de la secuencia de ADN de VPH de alto riesgo si estuviera presente en la muestra.

De las 38 muestras discordantes Reactivas por CE y No reactivas por hc2, se demostraron los tipos de VPH de alto

riesgo por secuenciación de ADN de la región L1 (cebadores MY09/MY11 y/o GP5+/GP6+) en 18 muestras (47,4 %). Adicionalmente 13 muestras adicionales se mostraron tener VPH de alto riesgo usando cebadores XEN-HPV-F/-R, haciendo un total de 21/38 (81,6 %) que contenían VPH de alto riesgo (Tabla 8).

- 5 De las 38 muestras discordantes Reactivas por hc2 pero No reactivas por CE, se demostraron los tipos de VPH de alto riesgo por secuenciación de ADN de la región L1 (cebadores MY09/MY11 y/o GP5+/GP6+) en 4 muestras. Seis muestras adicionales se mostraron tener VPH de alto riesgo usando cebadores XEN-HPV-F/-R. Estos últimos cebadores fallaron al detectar la muestra por CE pero amplificaron un producto para la secuenciación posiblemente por el bajo título de VPH. Esto puede ser porque la PCR que usa cebadores XEN-HPV-F/-R para la detección se
- 10 llevó a cabo durante 40 ciclos frente a 45 ciclos para la secuenciación. Las seis últimas muestras cuando se amplificaron usando los pares de cebadores MY09/11 y/o GP5+/GP6+ no produjeron producto de VPH o bien un tipo de riesgo bajo. En todos, 10 de 34 (29,4 %) de muestras Reactivas por hc2 pero no por CE se mostró que contenían VPH de alto riesgo (Tabla 8).
- 15 El uso de cebadores XEN-HPV-F/-R junto con los resultados de secuenciación indicó que el ensayo hc2 generó tanto más resultados Falsos Positivos como Falsos Negativos (Tabla 8) que el ensayo CE. La concordancia de los ensayos Xenomics y hc2 con los resultados de secuenciación para este grupo de pacientes es 55/72 (76,4 %) y 17/72 (23,6 %), respectivamente. El ensayo de CE no detectó 5 muestras con VPH16, una VPH18, una VPH33, una VPH51 y una que contenía múltiples tipos de VPH de alto riesgo (16+33) (Tabla 9). Sin embargo ya que detectó
- 20 otras muestras con cada tipo excepto VPH51, estos Falsos Negativos pueden deberse a un bajo título (Tabla 10). Los presentes inventores no encontraron otros ejemplos de VPH51 en el presente conjunto de muestras, pero nótese que el VPH51 se amplificó y se secuenció usando solamente cebadores XEN-HPV-F/-R.
- 25 En comparación, el ensayo hc2 no detectó 13 muestras con VPH16, una VPH18, una VPH31, una VPH35, dos VPH45, una VPH52, una VPH58 y dos VPH59 y cuatro que contenían múltiples tipos de VPH de alto riesgo (16+45, 16+33, 16+56 y 18+31) (Tabla 10). 31 de 38 (81,6 %) muestras No reactivas por el ensayo hc2 contenían VPH de alto riesgo. La Tabla 11 lista las 13 de las 31 muestras que requerían usar cebadores XEN-HPV-F/-R para que se revelaran los tipos de alto riesgo. La secuenciación secundaria con los cebadores de la región L1 (cebadores MY09/MY11 y/o GP5+/GP6+) no detectaron VPH o tipos de bajo riesgo.

Muestras de bajo riesgo

- El ensayo CE detectó más mujeres positivas VPH de alto riesgo, incluyendo muchas marcadas como ASCUS y Normal, que el ensayo hc2 (Tabla 10). Algunas muestras proporcionadas por Simbiosys se categorizaron como
- 35 Control con un resultado de Pap normal pero no había resultado hc2 disponible. Otros se marcaron como Normal por frotis Pap y eran No reactivos por hc2. Las muestras de estos grupos se obtuvieron de poblaciones de alto riesgo incluyendo clínicas STD y burdeles. Los presentes inventores ensayaron 50 muestras designadas por Metropolis como bajo riesgo con un diagnóstico clínico de normal o no maligno. 3 de 50 (6,0 %) eran Reactivas por hc2 y seis (12,0 %) eran Reactivas por CE. De estas seis últimas muestras, cuatro contenían VPH de alto riesgo
- 40 (topos 16, 18 y 31) por secuenciación y dos no contenían evidencia de ADN de VPH.

Para examinar adicionalmente la prevalencia de la infección del VPH en una población asumida de bajo riesgo, los presentes inventores ensayaron 50 muestras de orina de mujeres embarazadas obtenidas de una población general en La India. Los resultados de Pap y hc2 no estaban disponibles de estos pacientes. De las 50, una fue reactiva por

45 el ensayo Xenomics CE. La secuenciación de ADN confirmó que esta muestra contenía VPH45 de alto riesgo.

Tabla 7. Tabla de contingencia del ensayo de hc2 de ADN de VPH de alto riesgo (QIAGEN) frente a ensayo Xenomics CE.

Xenomics CE	N.º de muestras con		
	Resultado ^a hc2		
Resultado del ensayo de VPH	Reactivo	No reactivo	Total
Reactivo	102	38	140
No reactivo	34	146	180
Total	136	184	320

^aConcordancia del 77,5% (248/320; CI 95 %, 72-81 %; p = 0,7), Sensibilidad 75,0 % (102/136; CI 95 %, 68,2-79 %), Especificidad 79,3 % (146/184; CI 95 %, 75,2-83 %), PPV 72,9 % (102/140; CI 95 %, 67-77 %), NPV 81,1 % (146/180; CI 95 %, 76-84 %), K = 0,53.

Tabla 8. Tabla de contingencia de discordantes de Xenomics CE / hc2 frente a secuenciación de ADN.

Resultados del ensayo de VPH CE/hc2	N.º de muestras con ADN de VPH de alto riesgo ^b por secuenciación		
	Positivo	Negativo	Total
CE +/hc2 -	31	7	38
CE -/hc2 +	10	24	34
Total	41	31	32

^aConcordancia del 76,4 % (55/72; CI 95 %, 65-84 %; p = 0,6), Sensibilidad 75,6 % (31/41; CI 95 %, 66-82 %), Especificidad 77,4 % (24/31; CI 95 %, 64-82 %), PPV 81,6 % (31/38; CI 95 %, 71-89 %), NPV 70,6 % (24/34; CI 95 %, 59-79 %), K = 0,52.

Tabla 9. Secuenciación, datos de Pap y etapa del cáncer para muestras no reactivas por el ensayo Xenomics CE.

Resultado de Pap	N.º de muestras hc2 reactivas/CE no reactivas	Genotipo VPH ^a
Etapa IVA	1	No se detectó VPH
Etapa IIIB	3	74, 61+ 16 , 16+33
Etapa IIIA	2	No se detectó VPH (2)
Etapa IIB	1	No se detectó VPH
Etapa IB	2	VPH desconocido de bajo riesgo, 16
CIN III	2	No se detectó VPH, 16
CIN II	3	No se detectó VPH, 16 , 33
CHIN I	8	6+18,84,66,53,35, No se detectó VPH (3)
LSIL	1	No se detectó VPH
ASCUS	9	6, 16 , 51 ,53, No se detectó VPH (5)
Normal	2	No se detectó VPH (2)

^a los genotipos diana de alto riesgo se muestran en negrita. Los números entre paréntesis se refieren al número de casos

5

Tabla 10. Secuenciación, datos de Pap y etapa del cáncer para muestras reactivas por el ensayo Xenomics CE y no reactivas por el ensayo hc2.

Resultado de Pap	N.º de muestras CE reactivas/ hc2 no reactivas	Genotipo VPH ^a
ASCUS	10	16 (7), 18 , 45 , 58
ASCUS	3	6+ 59 , 70+ 35 , 81+ 45
ASCUS	1	6
ASCUS	1	81
ASCUS	1	No se detectó VPH
Normal	7	16 (3), 18 (3), 31 (1)
Normal	4	16+45 , 61+ 59 , 6+ 16 , 32+ 52
Normal	1	6+ 18 +97
Normal	3	No se detectó VPH
Control	1	18
Control	1	16 +33
Control	1	70
Etapa IIB	3	16 , 16+56 , 18+31+45
Etapa IIB	1	16

^a los genotipos diana de alto riesgo se muestran en negrita. Los números entre paréntesis se refieren al número de casos

Tabla 11. Secuenciación de muestras de VPH de alto riesgo que eran no reactivas para el ensayo hc2, reactivas para el ensayo CE y detectadas solamente por el par de cebadores XEN-HVP-F/R de la región E1.

ID de muestra	Diagnóstico clínico	Resultados del ensayo hc2	Resultados del ensayo CE	Tipo VPH de alto riesgo determinado por secuenciación ^a	Cebadores para la secuenciación secundaria	Tipo de VPH a partir de la segunda secuenciación ^b
BW-117	Normal	neg	pos	59	MY09/11	61
BW-170	Normal	neg	pos	16	MY09/11	6
BW-176	Normal	neg	pos	18	MY09/11	6
MI-00051	Normal	neg	pos	16	MY09/11	Tipo indeterminado
MI-00064	Normal	neg	pos	18	MY09/11	Negativo
MI-00071	Normal	neg	pos	31	MY09/11	Negativo
BW-154	Normal	neg	pos	52	MY09/11, GP5+/6+	Negativo, 32
BW-109	ASCUS	neg	pos	45	MY09/11	CY11-456/81
BW-159	ASCUS	neg	pos	59	MY09/11	6
BW-172	ASCUS	neg	pos	35	MY09/11	70
S-G (P3)	II B	neg	pos	18/31,45	GP5+/6+	Negativo
M-B (P4)	IIB	neg	pos	16	MY09/11	Tipo indeterminado
UD (P18)	IIIB		pos	16	MY09/11	Tipo
		neg				indeterminado

^a Secuenciación realizada usando cebadores XEN-HVP-F/R. Los genotipos diana de alto riesgo se muestran en negrita. ^b Secuenciación realizada usando cebadores de la bibliografía MY09/11 y/o GP5+/6+

Se examinó la viabilidad de usar orina como una matriz de muestra para detectar VPH de alto riesgo. El ensayo de VPH Xenomics podría proponerse por lo tanto como un ensayo de exploración cualitativo eliminando de esta manera la necesidad de un ensayo Pap u otros ensayos moleculares para explorar.

La concordancia del ensayo de VPH Xenomics cuando se compara con el ensayo hc2 fue 77,5 % (248/320, $K = 0,5$; $p = 0,7$), con Sensibilidad y Especificidad globales de 75,0 % (102/136) y 79,3 % (146/184) respectivamente (Tabla 7). El coeficiente kappa de 0,5 indica acuerdo moderado entre los dos ensayos. De las 320 muestras de orina analizadas, 72 dieron resultados discordantes con el ensayo hc2 basado en el espécimen cervical y se examinaron adicionalmente por secuenciación de ADN para la resolución. Usándose la secuenciación de ADN como el patrón de oro, el ensayo de CE era más sensible y específico con una tasa de Falsos Negativos y Falsos positivos demostrada de 10/180 (5,6 %) y 7/140 (5,0 %) respectivamente. El ensayo hc2 en comparación tuvo una tasa de Falsos Negativos y Falsos positivos de 31/184 (16,8 %) y 24/136 (5,0 %) respectivamente

La mayoría de las muestras no reactivas por el ensayo hc2 y reactivas por el ensayo Xenomics fueron bien ASCUS o citología normal por el ensayo Pap. Los tipos de VPH 16, 18 y 45 contaron para 16/38 (42 %), 7/38 (18,4 %) y 4/38 (10,5 %) de las muestras perdidas. La prevalencia de la infección del virus del papiloma humano de alto riesgo tipo 16/18 entre las mujeres con citología normal en poblaciones indias se ha informado previamente (Gupta S. et al. Cytopathology 2008; doi:10.1111/j.1365-2303.2008.00611). Globalmente la prevalencia de VPH entre mujeres citológicamente normales en este estudio fue el 16,6 %. Se detectó VPH16 en el 10,1 %, mientras que el VPH18 se detectó en el 1 % de las mujeres. Previamente también se informó el descubrimiento de que el ensayo hc2 QIAGEN tiene una detección menor del VPH de alto riesgo en mujeres por encima de 30 años con citología normal o CIN1 cuando se compara con los otros ensayos basados en PCR (Stevens M.P. et al. J Clin Microbiol 2007; 45:2130-2137). Más del 80 % de la presente población de muestreo también estaba por encima de 30 años.

Algunas muestras normales por el ensayo Pap y no reactivas por el ensayo hc2 pero reactivas por el ensayo Xenomics tenían infecciones mixtas con tipos de VPH de alto y bajo riesgo. Esto refuerza la noción de que los presentes cebadores que marcan como diana la región E1 del VPH pueden detectar VPH de alto riesgo en condiciones cuando los ensayos convencionales actualmente en uso no pueden. La incapacidad de los polímeros para marcar como objetivo la región L1 para detectar ciertos tipos de VPH de alto riesgo (VPH 48, 51, 52, 68) se ha informado previamente (Depuydt C.E. et al. J Cell Mol Med 2007; 11:881-891). Esto puede explicarse por la delección de la región L1 en estas muestras. Alternativamente los pares de cebadores MY09/MY11 y GP5+/GP6+ no son específicos; por lo tanto la presencia o la abundancia de tipos de VPH de bajo riesgo puede confundir los intentos para secuenciar cualquier VPH subyacente de alto riesgo.

El ensayo VPH Xenomics era incapaz de detectar tipos de VPH de alto riesgo en 10 muestras hc2 reactivas confirmadas por secuenciación de ADN (Tabla 9). Seis de las 10 muestras estaban en etapa CIN 2 y mayores. Una

explicación posible es la delección de la región E1 del VPH (Arias-Pulido H. et al. J Clin Microbiol 2006; 44:1755-1762). En 3 de las 6 muestras, solamente los cebadores XEN-HVP-F/R generaron un producto de PCR que, tras la secuenciación, contenían VPH de alto riesgo. Los cebadores XEN-HVP-F/R confirmaron la presencia de VPH33 de alto riesgo en una cuarta muestra. Esto indica que la región E1 por lo tanto no estaba eliminada. Las condiciones de la PCR usada para secuenciar en oposición a la detección, incluyendo el ADN polimerasa JumpStart y el número de ciclos, pueden proporcionar un sistema de amplificación más sensible. El ensayo CE de ADN de VPH equilibra la sensibilidad y la especificidad de tal manera que algunas muestras de VPH de bajo título pueden no detectarse. El resultado es un ensayo con menos resultados falsos positivos y falsos negativos en comparación con un ensayo disponible en el mercado.

La tabla 12 considera la comparación de ensayos cuando el resultado de hc2 se combina con la secuenciación de ADN usando tanto cebadores de la bibliografía (cebadores MY09/MY11 y/o GP5+/GP6+) como cebadores XEN-HVP-F/R para resolver muestras discordantes. En este caso, la concordancia es del 94,7 % (303/320, $K = 0,89$, $p = 0,6$). La sensibilidad del ensayo es el 93,0 % (133/143); la Especificidad es el 96,0% (170/177). Los valores predictivos positivos y negativos son 95,0 % (133/140) y 94,4 % (170/180), respectivamente. El valor kappa de 0,89 indica un acuerdo excelente entre los dos métodos. Por lo tanto el ensayo QIAGEN hc2 combinado con los resultados de secuenciación usando cebadores que marcan como diana las regiones E1 como L1 del genoma del VPH parece equivalente al presente ensayo CE ($p = 0,6$).

De esta manera, la sensibilidad del ensayo de VPH basado en orina es similar a o mejor que el actualmente usado ensayo hc2 basado en el análisis de las células cervicales. Una sensibilidad mayor del ensayo CE en comparación con otros estudios basados en ADN de orina puede explicarse por varios factores. Primero, en los presentes experimentos el ADN se aisló de la orina completa, no de una fracción celular. Esto es crítico en la recuperación global del ADN del VPH. Además de cruzarse los fragmentos de cromatina de las células cervicales que mueren, las secuencias de ADN del VPH pueden estar contribuidas por el ADN transrenal (ADN-Tr) (Melkonyan H.S. et al. Ann N Y Acad Sci 2008; 1137:73-81). Esta afirmación está soportada por el hecho de que en los experimentos de secuenciación los presentes cebadores diseñados para amplificar amplicones más cortos (88 pb) detectaron más VPH de alto riesgo que los cebadores MY09/MY11 diseñados para amplificar un amplicón más largo de 450 pb. Estos resultados también demuestran que el uso de una diana de ADN más corta para la PCR aumenta la sensibilidad de la detección del VPH en las muestras de orina. Segundo, la técnica basada en Q-resina para el ADN urinario es más eficaz para el aislamiento de fragmentos de ADN cortos que los métodos basados en sílice.

Algunas diferencias de detección de VPH de alto riesgo pueden surgir de la comparación del muestreo de orina y de células cervicales. Desafortunadamente, las células cervicales no estaban disponibles en este estudio para la comparación directa. Uno podría postular que algunas muestras no reactivas por el ensayo CE podrían ser el resultado de diferentes reglas de higiene aplicadas a los pacientes del hospital.

Se han publicado numerosos informes comparando el ensayo hc2 con otros ensayos moleculares, sin embargo, todos estos ensayos están basados en células cervicales de pacientes. Este es un primer informe que detecta el ADN del VPH a partir de la orina usando cebadores que marcan como diana la región E1 del genoma del VPH. Este informe también eleva cuestiones sobre el uso de los ensayos Pap y hc2 en la exploración de VPH de alto riesgo en mujeres en La India y otros países en desarrollo. La incidencia y la mortalidad del cáncer cervical se han mantenido altamente descontroladas en estos países, principalmente por la carencia o la ineficacia de los programas de exploración. Ya que la no invasividad y la simplicidad de la recogida de las muestras son importantes para la aceptación de los ensayos de exploración, el uso de una simple recogida de orina en lugar de un raspado de células cervicales puede potenciar la implementación de los ensayos de exploración del VPH para el cáncer cervical tanto en países desarrollados como en desarrollo.

Tabla 12. Combinación de la Secuenciación de ADN con los resultados de hc2 en comparación con los resultados del ensayo CE: Inclusión de cebadores de la bibliografía (cebadores MY09/MY11 y/o GP5+/GP6+) y resultados de secuenciación del cebador XEN-HVP-F/R para resolver los resultados discordantes de CE/hc2.

Xenomics CE	Evidencia de la presencia de VPH ^{a,b} de alto riesgo		
	Positivo	Negativo	Total
Resultado del ensayo de VPH			
Reactivo	133	7	140
No reactivo	10	170	180
Total	143	177	320

^aConcordancia del 94,7% (303/320; CI 95 %, 91,7-96,6 %; $p = 0,6$), Sensibilidad 93,0 % (133/143; CI 95 %, 89,6-95 %), Especificidad 96,0% (170/177; CI 95 %, 93,3-97,8 %), PPV 95,0 % (133/140; CI 95 %, 91,6-97 %), NPV 94,4 % (170/180; CI 95 %, 91,8-96 %), $K = 0,89$.

^bLa evidencia consiste en un resultado de hc2 Reactivo y/o presencia de VPH de riesgo alto como se demuestra por secuenciación de ADN.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para diagnosticar una infección por virus del papiloma humano (VPH) en un paciente, que comprende:

- (a) obtener una muestra de orina de dicho paciente; y
- (b) detectar una o más secuencias del gen E1 del VPH en dicha muestra de orina, comprendiendo la detección el uso del par de cebadores SEQ ID NO: 41 y 42 y en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); donde detectar una o más secuencias del gen E1 del VPH indica la presencia de al menos un virus del papiloma humano, diagnosticando de esta manera una infección por VPH en un paciente.

2. El método de la reivindicación 1, donde dichas secuencias son ADN transrenal.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, donde dicha etapa de detección incluye una técnica seleccionada de PCR de cebador anidado o PCR a Tiempo Real.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde SEQ ID NO: 41 está marcada de forma fluorescente, opcionalmente donde la SEQ ID NO: 41 está marcada con FAM.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la degradación de ácidos nucleicos en dicha muestra de orina se reduce.

6. El método de la reivindicación 5, donde reducir la degradación de ácidos nucleicos comprende inhibir la actividad nucleasa por pH aumentado, concentración de sal aumentada, inactivación por calor o tratando dicha muestra de orina con un compuesto seleccionado de ácido etilendiaminotetraacético, HCl de guanidina, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina o dodecilsulfato sódico.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa (b) comprende aislar sustancialmente dichos ácidos nucleicos en dicha muestra de orina.

8. El método de la reivindicación 7, donde dicho aislamiento es por precipitación o usando un material adsorbente sólido.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente filtrar dicha muestra de orina para retirar contaminantes, opcionalmente donde dicho filtrado:

- a) retira ácidos nucleicos que comprenden más de aproximadamente 1000 nucleótidos, o
- b) retira ácidos nucleicos que comprenden más de aproximadamente 300 nucleótidos.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de cuantificar dichos ácidos nucleicos.

11. el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la detección permite la detección diferencial del VPH de tipo alto riesgo.

12. Un oligonucleótido que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 41 o 42.

13. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 12, donde SEQ ID NO: 41 está marcada de forma fluorescente, opcionalmente donde la SEQ ID NO: 41 está marcada con FAM.

14. Un par de cebadores de oligonucleótidos que comprenden SEQ ID NO: 41 o 42.

15. Un par de cebadores de oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 14, donde SEQ ID NO: 41 está marcada de forma fluorescente, opcionalmente donde la SEQ ID NO: 41 está marcada con FAM.

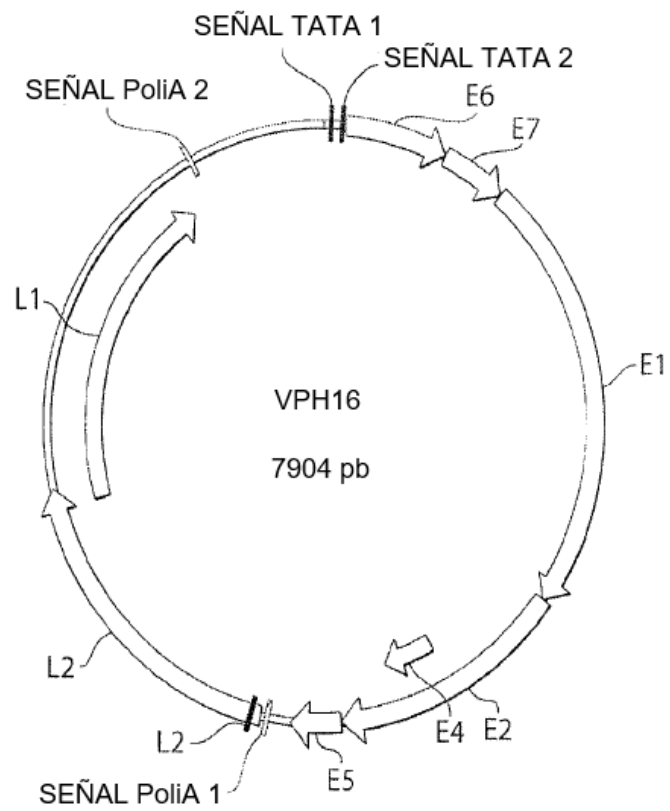


Fig. 1

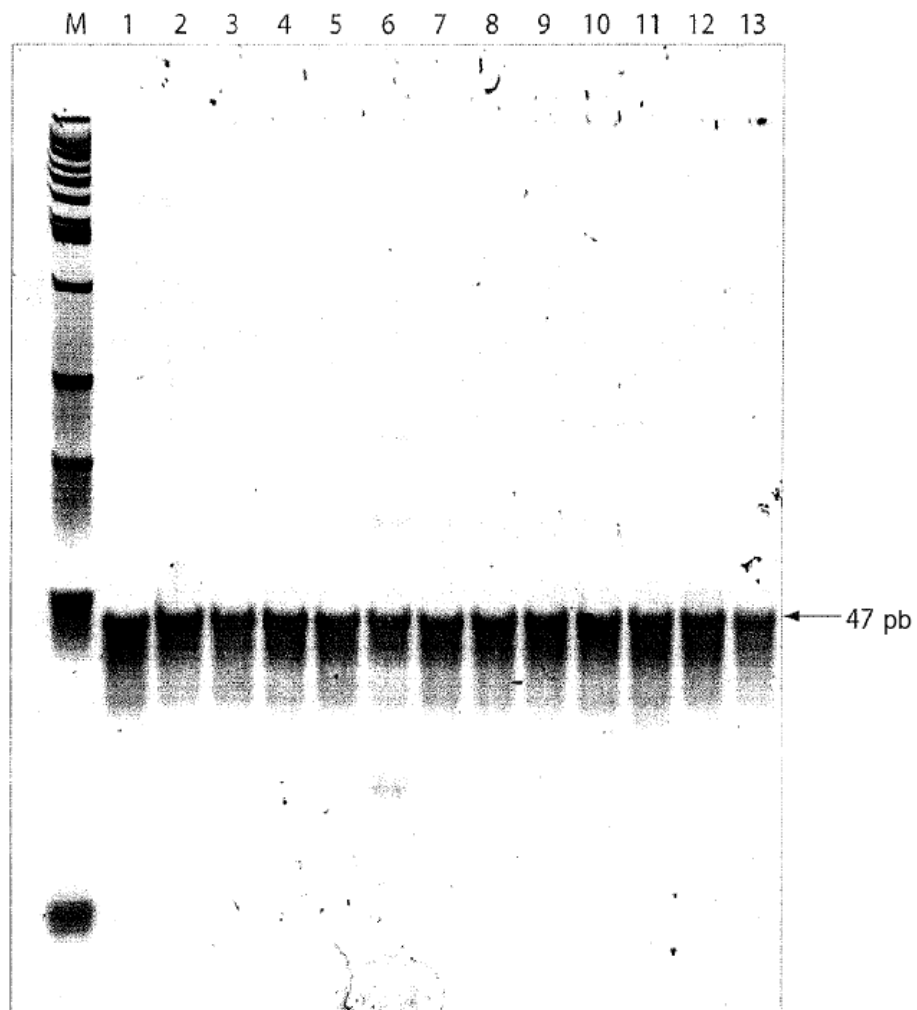


Fig. 2

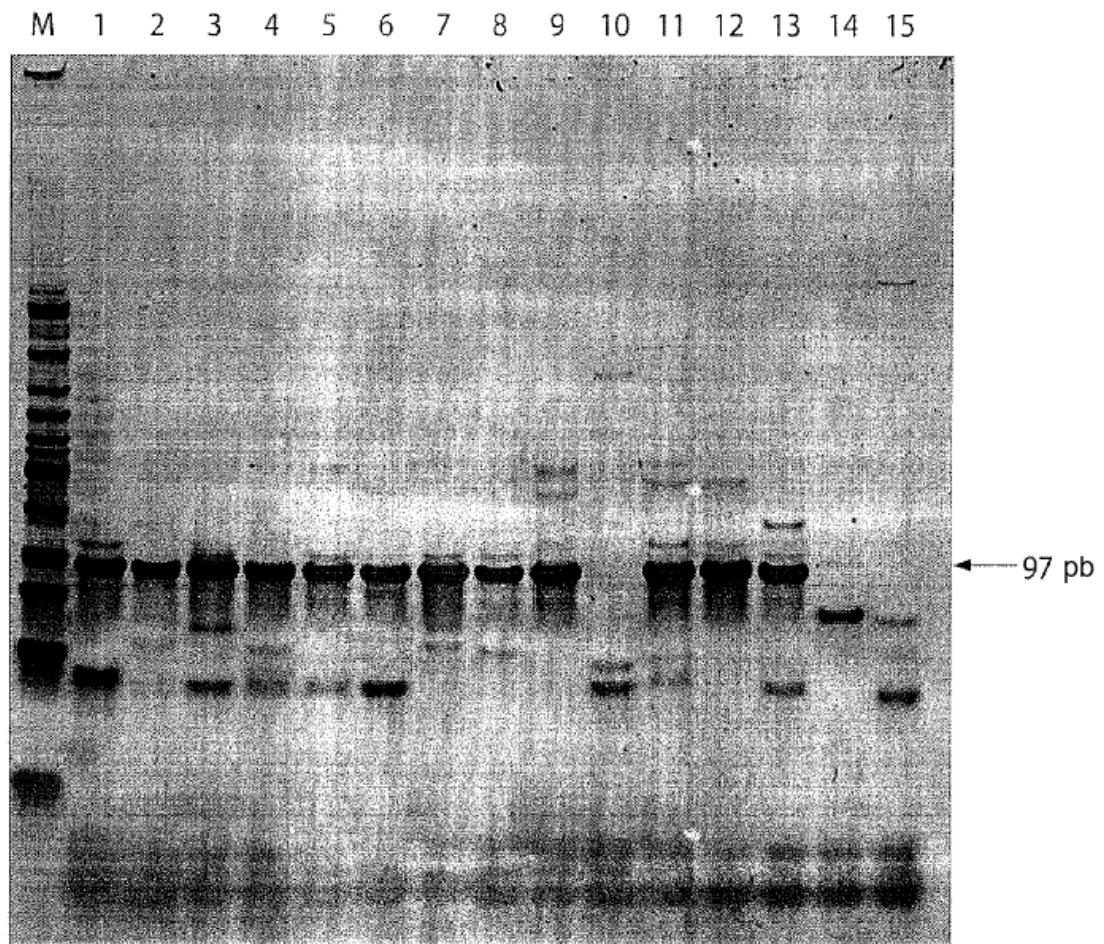


Fig. 3

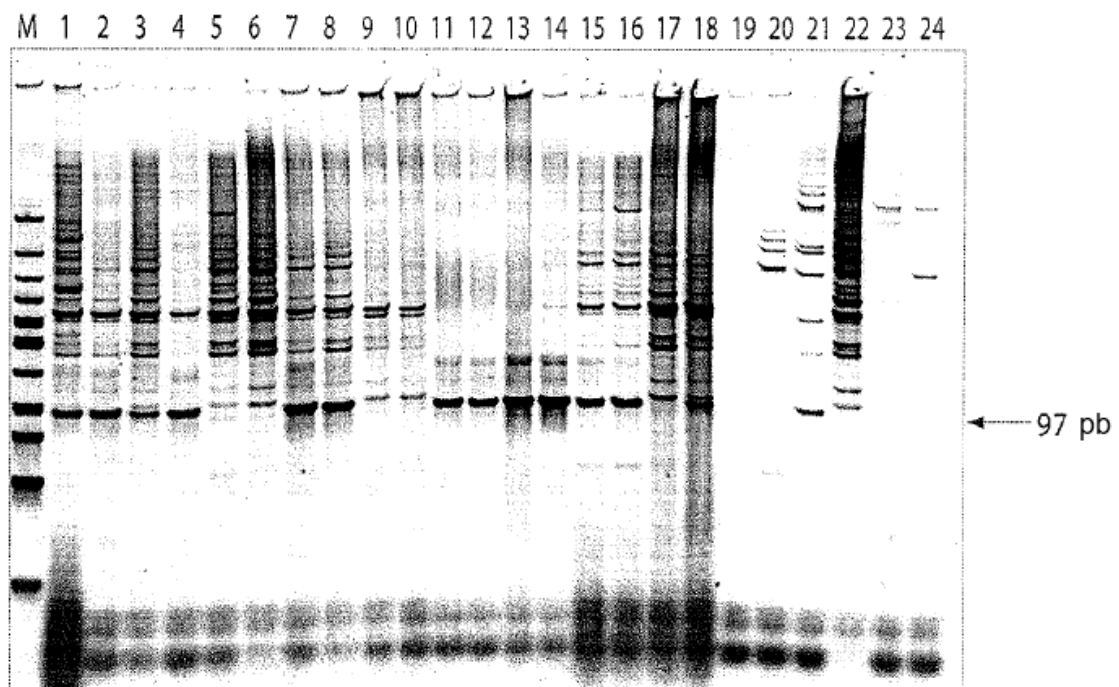


Fig. 4

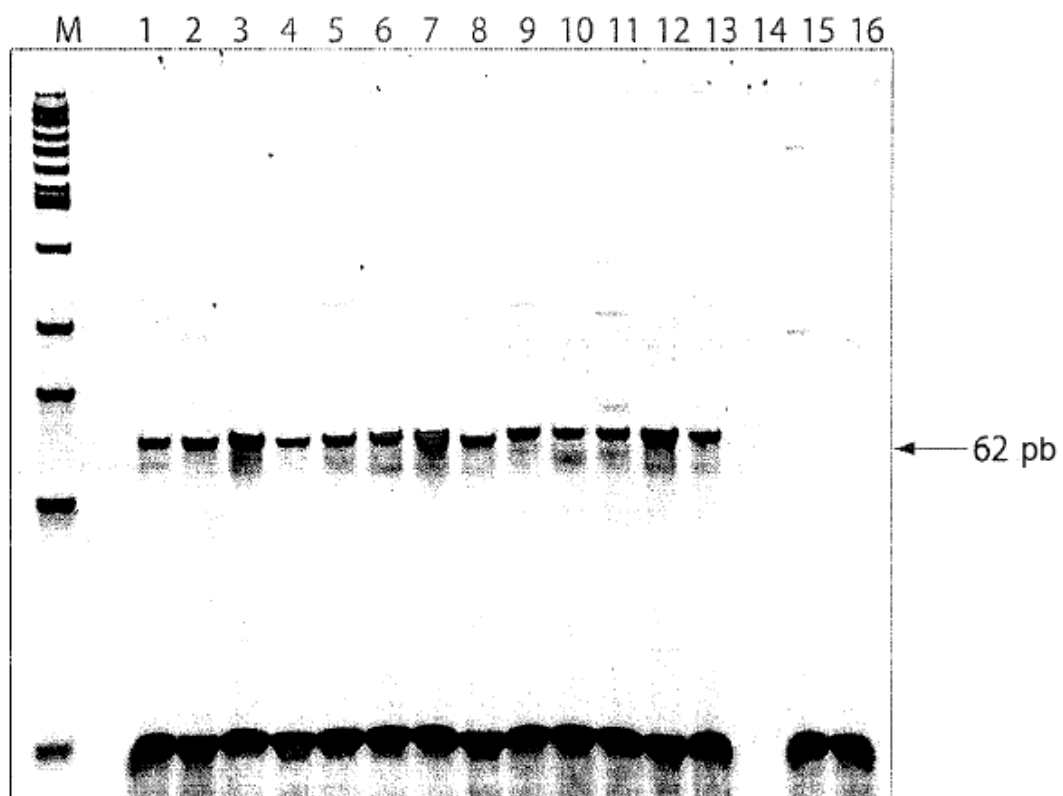


Fig. 5

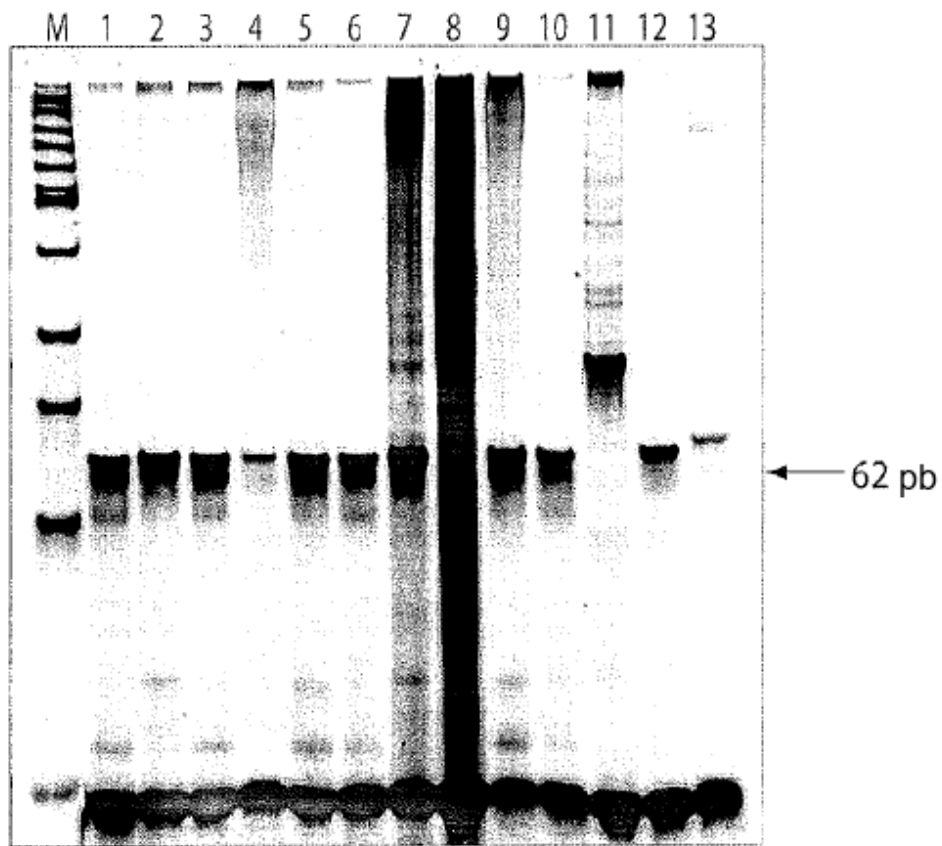


Fig. 6

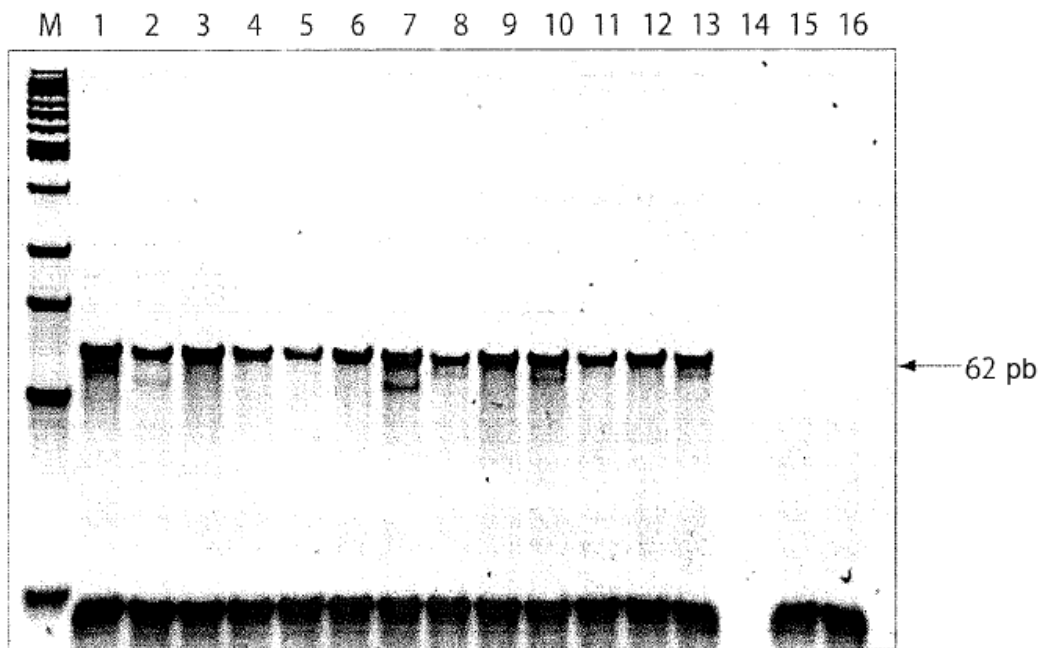


Fig. 7