

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 432**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2009 E 12177093 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2565280**

54 Título: **Cebadores y sondas para detectar virus del papiloma humano y secuencias de beta globina humana en muestras de ensayo**

30 Prioridad:

30.09.2008 US 241119

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

02.08.2017

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)
100 Abbott Park Rd.
Abbott Park, IL 60064, US**

72 Inventor/es:

**ABRAVAYA, KLARA;
ERICKSON, BRIAN, J.;
HUANG, SHIHAI, X.;
MAK, WAI-BING, X.;
SALITURO, JOHN, A. y
TANG, NING**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 628 432 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

Cebadores y sondas para detectar virus del papiloma humano y secuencias de beta globina humana en muestras de ensayo

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a conjuntos de cebadores y sondas, métodos y kits para detectar virus del papiloma humanos, secuencias de virus del papiloma humano y de beta globina humana en una muestra de ensayo.

10

Antecedentes

Los virus del papiloma son virus de ADN que infectan la piel y las membranas mucosas de seres humanos y animales. Se han identificado aproximadamente 130 tipos de virus del papiloma humano (VPH), de los cuales entre 30 y 40 tipos se transmiten por contacto sexual e infectan la región anogenital. Algunos de estos tipos de VPH causan verrugas genitales, mientras que otros no causan signos evidentes de infección. Al menos 14 tipos de VPH se han asociado con un alto riesgo de cáncer cervical, a saber, los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. La detección de estos tipos de alto riesgo de VPH es importante en la prevención del cáncer cervical.

15

20

El genoma de todos los tipos de VPH se organiza de manera similar. Algunas proteínas tempranas (E) y tardías (L) se codifican específicamente. Las proteínas E1 y E2 son necesarias para la replicación del ADN. Las proteínas E4 y E5 son necesarias para la replicación del genoma viral en las capas superiores del epitelio. Las proteínas E6 y E7 son oncogénicas y cooperan para inmortalizar las células y para inducir la inestabilidad genómica. Las proteínas L1 y L2 forman la cápside viral y se expresan tarde en la infección en las capas superiores del epitelio. Otra parte del genoma, es decir, la región de control largo (LCR), contiene la mayor parte de las secuencias de ADN reguladoras necesarias para la replicación adecuada del genoma viral y la expresión de los genes virales.

25

30

Se han ideado una variedad de métodos para detectar tipos de VPH de alto riesgo. Muchos se basan en la detección de secuencias únicas en el genoma del VPH. Por ejemplo, se han descrito sondas de ADN o ARN complementarias a una porción de los genes del tipo 35 de VPH, tal como en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.849.332, que son útiles en la detección de la presencia de este tipo de VPH en muestras de ensayo. Las secuencias de sondas adicionales útiles para detectar tipos oncogénicos de VPH se describen en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.265.154. La Patente de Estados Unidos Núm. 5.705.627 ilustra el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar y detectar ADN de VPH utilizando cebadores degenerados o consenso mixtos, seguido de tipificación utilizando una mezcla de sondas de ADN específicas de genotipo. Otros ejemplos de uso de cebadores consenso se pueden encontrar en la Patente de Estados Unidos Núm. 5364.758 y Kleter, B. et al., Am. Chem. J. of Pathology, 1998, 153(6): 1731-39. Además, muchos de los métodos conocidos en la técnica también implican la detección de secuencias de beta globina humana en muestras de ensayo.

35

40

El documento WO 95/22626 describe un conjunto de cebadores denominado GP5+/GP6+ que representa un conjunto mejorado de cebadores para la amplificación y tipificación de VPH en frotis cervicales sobre cebadores GP5/GP6 usados previamente. El documento WO 03/076667 proporciona una mejora sobre los cebadores conocidos utilizando una mezcla de múltiples cebadores que comprende adicionalmente cebadores que se suman a los ya conocidos en la técnica que permiten la detección de un conjunto extendido de tipos de VPH. Schmitt et al., J. Clinical Microbiology, vol. 46, núm. 3, marzo de 2008, páginas 1050-1059 describen un intento de proporcionar cebadores mejorados añadiendo otros cebadores a los de GP5+/GP6+.

45

50

Como se ha ilustrado anteriormente, se conoce en la técnica una diversidad de métodos para detectar tipos de VPH de alto riesgo. A pesar de tales métodos, existe una necesidad en la técnica de nuevos métodos que: (1) sean capaces de detectar múltiples genotipos de VPH en una única reacción mientras que al mismo tiempo diferencian la detección de ciertos genotipos específicos de otros (p.ej., genotipificación parcial); (2) no presentan reactividad cruzada entre los tipos de VPH; (3) proporcionan una sensibilidad clínica robusta y especificidad; y (4) proporcionan un alto rendimiento y un flujo de trabajo eficiente.

55

Compendio

El alcance de la invención y diversas realizaciones de la invención se definen mediante las reivindicaciones adjuntas.

60

En una realización, la presente invención se refiere a un conjunto de cebador y sonda para detectar tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 en una muestra de ensayo. El conjunto de cebador y sonda comprende:

- (a) tres cebadores directos que consisten en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o complementos

de los mismos y dos cebadores inversos que consisten en: SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 o complementos de los mismos ; y

5 (b) catorce sondas que consisten en: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21 o complementos de los mismos.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un método para detectar uno o más tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 en una muestra de ensayo. El método comprende las etapas de:

10 (a) poner en contacto la muestra de ensayo con tres cebadores directos que consisten en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o complementos de los mismos y dos cebadores inversos que consisten en: SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 o complementos de los mismos en condiciones de amplificación para generar una primera secuencia diana; y

15 (b) detectar la hibridación entre la primera secuencia diana y al menos una sonda como una indicación de la presencia de uno o más tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 de VPH en la muestra de ensayo, en donde la sonda consiste en: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21 o complementos de los mismos.

20 En el método descrito anteriormente, las condiciones de amplificación comprenden someter la muestra de ensayo a una reacción de amplificación llevada a cabo en presencia de reactivos de amplificación adecuados. Además, la reacción de amplificación puede comprender la utilización de PCR, PCR en tiempo real (tal como, pero sin limitarse a, un ensayo Taq-Man®) o PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR).

25 En el método descrito anteriormente, al menos una sonda está marcada con un marcador detectable. Como se conoce en la técnica, el marcador detectable se puede unir directamente a al menos una sonda. Alternativamente, el marcador detectable se puede unir indirectamente a al menos una sonda. Además, el marcador detectable puede ser directamente detectable. Alternativamente, el marcador detectable puede ser indirectamente detectable. Por ejemplo, el marcador detectable puede comprender un radical fluorescente unido al extremo 5' de al menos una sonda. Además, al menos una sonda puede comprender adicionalmente un radical desactivador unido en su extremo 3'.

Además, el método descrito anteriormente puede comprender adicionalmente las etapas de:

35 (a) poner en contacto la muestra de ensayo con un cebador directo que consiste en el SEQ ID NO: 6 o uno de sus complementos y un cebador inverso que consiste en el SEQ ID NO: 7 o uno de sus complementos en condiciones de amplificación para generar una segunda secuencia diana; y

40 (b) detectar la hibridación entre la segunda secuencia diana y la sonda que consiste en el SEQ ID NO: 22 o uno de sus complementos como una indicación de la presencia de una beta globina humana en la muestra de ensayo.

En otra realización más, la presente invención se refiere a un método para detectar y/o diferenciar tipos de VPH 16, 18 o ambos tipos de VPH 16 y 18 en una muestra de ensayo. El método comprende las etapas de:

45 (a) poner en contacto la muestra de ensayo con tres cebadores directos que consisten en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o complementos de los mismos y dos cebadores inversos que consisten en: SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 o complementos de los mismos en condiciones de amplificación para generar una primera secuencia diana;

50 (b) detectar la hibridación entre la primera secuencia diana y lo siguiente:

(i) una primera sonda que consiste en el SEQ ID NO: 8 o uno de sus complementos como una indicación de la presencia de VPH tipo 16, en donde dicha primera sonda está marcada con un primer marcador detectable;

55 (ii) una segunda sonda que consiste en la SEQ ID NO: 9 o uno de sus complementos como una indicación de la presencia de VPH tipo 18, en donde dicha segunda sonda está marcada con una segunda marca detectable y adicionalmente en donde la segunda marca detectable es una marca detectable diferente de la primera marca detectable;

60 (iii) una o más sondas adicionales que consisten en: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 21 o complementos de los mismos como una indicación de la presencia de tipos de VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ó 68, en donde cada una de las una o más sondas adicionales está marcada con una tercera marca detectable idéntica y adicionalmente en donde dicha tercera marca detectable es una marca detectable diferente de la primera marca detectable y la segunda marca detectable.

En el método descrito anteriormente, las condiciones de amplificación comprenden someter la muestra de ensayo a una reacción de amplificación llevada a cabo en presencia de reactivos de amplificación adecuados. Además, la reacción de amplificación puede comprender el uso de PCR, PCR en tiempo real (tal como, pero sin limitarse a, un ensayo Taq-Man®) o RT-PCR.

5 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un kit de cebador y sonda para detectar tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 en una muestra de ensayo. El kit comprende:

10 (a) tres cebadores directos que consisten en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o complementos de los mismos y dos cebadores inversos que consisten en: SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 o complementos de los mismos ;

(b) catorce sondas que consisten en: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21 o complementos de los mismos; y

15 (c) reactivos de amplificación.

El kit anterior puede comprender adicionalmente un cebador directo que consiste en el SEQ ID NO: 6 o uno de sus complementos y un cebador inverso que consiste en el SEQ ID NO: 7 o uno de sus complementos y una sonda que consiste en el SEQ ID NO: 22 o uno de sus complementos para detectar beta globina humana en la muestra de ensayo.

20

Breve descripción de las figuras

25 La Figura 1 muestra la correlación entre la señal de la beta globina y la cantidad de células marcadas de una línea celular positiva a VPH cultivada y la distribución del número de ciclos de la beta globina para una población de 1206 muestras cervicales del paciente como se describe en el Ejemplo 4.

La Figura 2 muestra la distribución del número de ciclos de beta globina para una población de 1206 muestras cervicales de pacientes como se describe en el Ejemplo 4. Cuantiles para la correlación descrita anteriormente en la Figura 1.

30 Las Figuras 3A - 3D muestran una comparación del rendimiento analítico de una mezcla de cebadores que comprende los SEQ ID NOS: 1-5 para los cebadores GP5+ y GP6+ (SEC ID NO: 23-24) como se describe en el Ejemplo 5.

35 Las Figuras 4A - 4E muestran una comparación del rendimiento analítico de las sondas utilizadas en la presente invención específicas para los tipos de VPH 16, 18, 31, 52 y 59 (SEC ID NO: 8-10, 16 y 19) con respecto a las secuencias de la sonda para los mismos tipos de VPH descritos en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.265.154B1 como se describe en el Ejemplo 5.

Descripción detallada

40 La presente invención se refiere a conjuntos de cebadores y sondas que se pueden usar para amplificar y/o detectar tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 en un muestra de ensayo. La presente invención se refiere también a métodos de detección de tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 en muestras de ensayo utilizando los conjuntos de cebadores y sondas descritos en la presente memoria. Además, la presente solicitud también describe cebadores, sondas y conjuntos de cebadores y sondas que se pueden utilizar para amplificar y/o detectar secuencias de beta globina humana en una muestra de ensayo. Los cebadores y sondas utilizados para amplificar y/o detectar beta globina humana en una muestra de ensayo se pueden usar para generar amplicones de control interno en un ensayo de VPH. La presente invención también se refiere a kits para detectar tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 y secuencias de beta globina humana en una muestra de ensayo.

50 Los conjuntos de cebadores y sondas de la presente invención consiguen una sensibilidad y una especificidad clínicas robustas. Además, los conjuntos de cebadores y sondas descritos en la presente memoria descriptiva no muestran reactividad cruzada entre los tipos de VPH. Además, los conjuntos de cebadores y sondas de la presente invención son capaces de detectar múltiples genotipos de VPH en una única reacción mientras que al mismo tiempo diferencian la detección de ciertos genotipos de otros (p.ej., genotipificación parcial). Finalmente, los conjuntos de cebadores y sondas de la presente invención proporcionan un alto rendimiento y un flujo de trabajo eficiente.

55

A. Definiciones

60 Según se utiliza en la presente memoria, las formas singulares "un", "una" y "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Para la recitación de intervalos numéricos en la presente memoria, se contempla explícitamente cada número intermedio entre los mismos con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, para el intervalo 6-9, se contemplan los números 7 y 8 además de 6 y 9, y para el intervalo de 6,0-7,0, se contemplan explícitamente los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0.

a) Amplición

Según se utiliza en la presente memoria, el término "amplición" se refiere a un producto de una reacción de amplificación natural o artificial. Un ejemplo de un amplición es un producto de ADN o ARN (usualmente un segmento de un gen, ADN o ARN) producido como resultado de PCR, PCR en tiempo real, RT-PCR, RT-PCR competitiva, reacción en cadena de ligasa (LCR), reacción de reparación de la cadena "gap LCR", amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación mediada por transcripción (TMA) o similares.

b) Amplificación, método de amplificación o reacción de amplificación

Según se utiliza en la presente memoria, las frases "amplificación", "método de amplificación" o "reacción de amplificación", referidas indistintamente en la presente memoria, se refieren a un método o procedimiento que aumenta la representación de una población de secuencias específicas de ácido nucleico (todos los tipos de ADN o ARN) (tales como una secuencia diana o un ácido nucleico diana) en una muestra de ensayo. Los ejemplos de los métodos de amplificación que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, PCR, PCR en tiempo real, RT-PCR, RT-PCR competitiva, LCR, reacción de reparación de la cadena "gap LCR", SDA, NASBA, TMA y similares, todos los cuales son conocidos por un experto en la técnica.

c) Condiciones de amplificación

Según se utiliza en la presente memoria, la frase "condiciones de amplificación" se refiere a condiciones que promueven la reasociación y/o la extensión de secuencias de cebadores. Tales condiciones son bien conocidas en la técnica y dependen del método de amplificación seleccionado. Por ejemplo, las condiciones de amplificación mediante PCR comprenden generalmente la ciclación térmica, p.ej., ciclación de la mezcla de reacción entre dos o más temperaturas. En las reacciones de amplificación isotérmica, la amplificación se produce sin ciclación térmica, aunque puede ser necesario un aumento inicial de temperatura para iniciar la reacción. Las condiciones de amplificación abarcan todas las condiciones de reacción incluyendo, pero no limitadas a, temperatura y ciclos de temperatura, tampón, sal, fuerza iónica, pH y similares.

d) Reactivos de amplificación

Según se utiliza en la presente memoria, la frase "reactivos de amplificación" se refiere a reactivos usados en reacciones de amplificación y pueden incluir, pero no se limitan a, tampones, reactivos, enzimas que tienen actividad transcriptasa inversa y/o polimerasa o actividad exonucleasa; cofactores enzimáticos tales como magnesio o manganeso; sales; y desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) tales como desoxiadenosina trifosfato (dATP), desoxiguanosina trifosfato (dGTP), desoxicitidina trifosfato (dCTP), desoxitimidina trifosfato (dTTP) y desoxiuridina trifosfato (dUTP). Los reactivos de amplificación pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la técnica dependiendo del método de amplificación empleado.

e) Directamente detectable e indirectamente detectable

Según se utiliza en la presente memoria, la frase, "directamente detectable", cuando se utiliza en referencia a una marca detectable o un radical detectable, significa que el marcador detectable o el radical detectable no requiere una reacción o manipulación adicional para ser detectable. Por ejemplo, un radical fluorescente es directamente detectable por métodos de espectroscopia de fluorescencia. Por el contrario, la frase "indirectamente detectable", cuando se utiliza en la presente memoria en referencia a un marcador detectable o un radical detectable, significa que el marcador detectable o el radical detectable se vuelven detectables después de una reacción o manipulación adicional. Por ejemplo, un hapteno se vuelve detectable después de la reacción con un anticuerpo apropiado unido a un indicador, tal como un colorante fluorescente.

f) Fluoróforo, radical fluorescente, marca fluorescente o colorante fluorescente

Los términos "fluoróforo", "radical fluorescente", "marca fluorescente" y "colorante fluorescente" se utilizan indistintamente en la presente memoria descriptiva y se refieren a una molécula que absorbe un cuanto de radiación electromagnética a una longitud de onda y emite uno o más fotones a una longitud de onda diferente, típicamente más larga, en respuesta a la misma. Son adecuados numerosos colorantes fluorescentes de una amplia variedad de estructuras y características para su uso en la práctica de la presente invención. Se conocen métodos y materiales para marcar fluorescentemente moléculas de ácido nucleico (Véanse, R. P. Haugland, "Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes, and Research Chemicals 1992-1994", 5ª Ed., 1994, Molecular Probes, Inc.). Preferiblemente, una marca o radical fluorescente absorben y emiten luz con alto rendimiento (p.ej., tienen un alto coeficiente de absorción molar a la longitud de onda de excitación utilizada y un rendimiento cuántico de fluorescencia elevado) y son fotoestables (p.ej., no experimentan degradación significativa después de la excitación luminosa en el plazo de tiempo necesario para realizar el análisis). En lugar de ser directamente detectables por sí mismos, algunos

colorantes fluorescentes transfieren energía a otro colorante fluorescente en un proceso llamado transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), y el segundo colorante produce la señal detectada. Dichos pares de colorantes fluorescentes FRET también están incluidos en el término "radical fluorescente". El uso del radical indicador/desactivador fluorescente conectado físicamente se encuentra también dentro del alcance de la presente invención. En estos aspectos, cuando el indicador fluorescente y el radical desactivador se mantienen en estrecha proximidad, tal como en los extremos de una sonda, el radical desactivador evita la detección de una señal fluorescente del radical indicador. Cuando los dos radicales están físicamente separados tal como después de la escisión por una ADN polimerasa, la señal fluorescente procedente del radical indicador se hace detectable.

g) Hibridación

Según se utiliza en la presente memoria, el término "hibridación" se refiere a la formación de complejos entre secuencias de ácido nucleico que son suficientemente complementarias para formar complejos a través de emparejamiento de bases de Watson-Crick o emparejamiento de bases no canónicas. Por ejemplo, cuando un cebador "se hibrida" con una secuencia diana (molde), tales complejos (o híbridos) son suficientemente estables para servir a la función de cebado requerida por, p.ej., la ADN polimerasa, para iniciar la síntesis de ADN. Un experto en la técnica apreciará que las secuencias de hibridación no necesitan tener complementariedad perfecta para proporcionar híbridos estables. En muchas situaciones, los híbridos estables se formarán donde menos de 10% de las bases sean emparejamientos erróneos. Por consiguiente, según se utiliza en la presente memoria, el término complementario se refiere a un oligonucleótido que forma un dúplex estable con su complemento en condiciones de análisis, generalmente cuando hay una homología mayor de aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98% o aproximadamente 99%. Los expertos en la técnica entienden cómo estimar y ajustar la rigurosidad de las condiciones de hibridación de tal manera que las secuencias que tienen al menos un nivel deseado de complementariedad hibridarán de forma estable, mientras que aquellas que tienen menor complementariedad no lo harán. Se pueden encontrar ejemplos de condiciones y parámetros de hibridación, por ejemplo en, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 1989, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Press: Plainview, NY; F.M. Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", 1994, John Wiley & Sons: Secaucus, NJ.

h) Marcado o marcado con una marca detectable

Según se utiliza en la presente memoria, los términos "marcado" y "marcado con una marca detectable (o agente o radical)" se utilizan indistintamente en la presente memoria y especifican que se puede visualizar una entidad (p.ej., un cebador o una sonda), por ejemplo después de la unión a otra entidad (p.ej., un producto de amplificación o amplicón). Preferiblemente, el marcador detectable se selecciona de tal manera que genera una señal que puede medirse y cuya intensidad está relacionada con (p.ej., es proporcional a) la cantidad de entidad unida. Es bien conocida en la técnica una amplia variedad de sistemas para marcar y/o detectar moléculas de ácido nucleico, tales como cebador y sondas. Los ácidos nucleicos marcados pueden prepararse por incorporación de, o conjugación a, un marcador que es detectable directa o indirectamente por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos, químicos u otros. Los agentes detectables adecuados incluyen, pero no se limitan a, radionúclidos, fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, micropartículas, enzimas, marcas colorimétricas, marcas magnéticas, haptenos, Balizas Moleculares, balizas de aptámeros y similares.

i) Cebador

El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis de un producto de extensión de cebador que es una cadena complementaria de ácido nucleico (todos los tipos de ADN o ARN) cuando se coloca en condiciones de amplificación adecuadas (p.ej., tampón, sal, temperatura y pH) en presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización de ácidos nucleicos (p.ej., una polimerasa dependiente de ADN o dependiente de ARN). El cebador puede ser de hebra sencilla o de doble hebra. Si es de doble hebra, el cebador se puede tratar primero (p.ej., desnaturalizar) para permitir la separación de sus hebras antes de ser utilizado para preparar productos de extensión. Dicha etapa de desnaturalización se lleva a cabo típicamente utilizando calor, pero puede llevarse a cabo alternativamente utilizando un álcali, seguido de neutralización. Los cebadores de la presente invención tienen una longitud de aproximadamente 15 a 50 nucleótidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, lo más preferiblemente, de aproximadamente 22 a 30 nucleótidos de longitud. Los cebadores de la presente invención pueden contener nucleótidos adicionales además de los descritos con más detalle en la presente memoria. Por ejemplo, los cebadores usados en SDA pueden incluir un sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción 5' a la secuencia de unión diana (Véanse, las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.270.184 y 5.455.166), los cebadores NASBA y TMA pueden incluir un promotor de ARN polimerasa unido a la secuencia de unión diana del cebador. Los métodos para conectar dichas secuencias especializadas con una secuencia de unión diana para uso

en una reacción de amplificación seleccionada son bien conocidos por los expertos en la técnica. Adicionalmente, en ciertos casos, se puede marcar un cebador con una marca detectable.

5 La frase "cebador directo" se refiere a un cebador que hibrida (o se reasocia) con la secuencia diana (p.ej., hebra molde). La frase "cebador inverso" se refiere a un cebador que hibrida (o reasocia) con la cadena complementaria de la secuencia diana. El cebador directo se hibrida con la secuencia diana 5' con respecto al cebador inverso.

j) Conjunto de cebadores

10 Según se utiliza en la presente memoria, el término "conjunto de cebadores" se refiere a dos o más cebadores que juntos son capaces de cebar la amplificación de una secuencia diana o ácido nucleico diana de interés (p.ej., una secuencia diana dentro del VPH). En ciertas realizaciones, el término conjunto de cebadores se refiere a un par de cebadores que incluye un cebador 5' (aguas arriba) que hibrida con el extremo 5' de la secuencia diana o ácido nucleico diana que se va a amplificar y un cebador 3' (aguas abajo) (o cebador inverso) que hibrida con el
15 complemento de la secuencia diana o ácido nucleico diana que se va a amplificar. Dichos conjuntos de cebadores o pares de cebadores son particularmente útiles en las reacciones de amplificación mediante PCR.

k) Sonda

20 Según se utiliza en la presente memoria, el término sonda se refiere a un oligonucleótido capaz de hibridar selectivamente con al menos una porción de una secuencia diana en condiciones de amplificación apropiadas (p.ej., una porción de una secuencia diana que ha sido amplificada). En general, se identifica una secuencia de sonda que es "complementaria" (es decir, complementaria a la hebra codificante o efectora (+)), o complementaria inversa (es decir, complementaria a la hebra antisentido (-)). Las sondas descritas en la presente memoria tienen una longitud
25 de aproximadamente 10-50 nucleótidos, preferiblemente aproximadamente 12-35 nucleótidos y más preferiblemente de 14-25 nucleótidos. En ciertos casos, una sonda puede marcarse con una marca detectable.

1) Conjunto de cebador y sonda

30 Según se utiliza en la presente memoria, la frase conjunto cebador y sonda se refiere a una combinación que comprende dos o más cebadores que juntos son capaces de cebar la amplificación de una secuencia diana o ácido nucleico diana y al menos una sonda que puede detectar la secuencia diana o ácido nucleico diana. La sonda hibrida generalmente con una cadena de un producto de amplificación (o amplición) para formar un híbrido de producto de amplificación/sonda, que puede ser detectado utilizando mecanismos de rutina conocidos por los
35 expertos en la técnica.

m) Secuencia diana o ácido nucleico diana

40 Las frases "secuencia diana" y "ácido nucleico diana" se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a aquella cuya presencia o ausencia se desea detectar. En el contexto de la presente invención, una secuencia diana incluye preferiblemente una secuencia de ácido nucleico con la que se complejarán uno o más cebadores. La secuencia diana también puede incluir una región de hibridación con la sonda con la que una sonda formará un híbrido estable bajo condiciones de amplificación apropiadas. Como reconocerá un experto en la técnica, una secuencia diana puede ser de hebra sencilla o de doble hebra. En el contexto de la presente invención, las
45 secuencias diana de interés están situadas dentro de la región L1 del VPH o del marco de lectura abierto del gen de la beta globina humana.

n) Muestra de ensayo

50 Según se utiliza en la presente memoria, el término "muestra de ensayo" se refiere generalmente a un material biológico que se está sometiendo a ensayo y/o se sospecha que contiene un analito de interés. En la presente invención, los analitos de interés son los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68, o combinaciones con secuencias de beta globina humana. La muestra de ensayo puede derivarse de cualquier fuente biológica, tal como un hisopo o cepillo cervical, vaginal o anal, o un fluido fisiológico que incluye, pero no se limita a,
55 sangre completa, suero, plasma, fluido intersticial, saliva, humor acuoso del cristalino, fluido cefalorraquídeo, sudor, orina, leche, fluido ascítico, mucosa, fluido nasal, esputo, fluido sinovial, fluido peritoneal, fluido vaginal, flujo menstrual, líquido amniótico, semen y etcétera. La muestra de ensayo se puede usar directamente según se obtiene de la fuente biológica o después de un pretratamiento para modificar el carácter de la muestra. Por ejemplo, dicho pretratamiento puede incluir preparar plasma a partir de sangre, diluir fluidos viscosos etcétera. Los métodos de pretratamiento también pueden implicar filtración, precipitación, dilución, destilación, mezcla, concentración,
60 inactivación de componentes que interfieren, adición de reactivos, lisis, etc. Además, también puede ser beneficioso modificar una muestra de ensayo sólida para formar un medio líquido o liberar el analito.

B. Cebadores, sondas y conjuntos de cebadores y sondas

ES 2 628 432 T3

En la presente memoria se describen cebadores para la amplificación de los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 del virus del papiloma humano (VPH) en una muestra de ensayo. Los cebadores consisten en las secuencias mostradas a continuación en la Tabla A o complementos de las mismas.

5

Tabla A

SEQ ID NO:	SECUENCIA	Tipo de Cebador
1	tattgttac tgtgtagat actac	Cebador Directo
2	caattgttg ttactgtgt ggatactac	Cebador Directo
3	ttttattac ctgtgtgat actac	Cebador Directo
4	gaaaaataaa ctgtaaatca tattcctc	Cebador Inverso
5	gaaaaataaa ttgcaattca tactcttc	Cebador Inverso

En la presente memoria se describen sondas para detectar tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 en una muestra de ensayo. Las sondas consisten en las secuencias que se muestran a continuación en la Tabla B o complementos de las mismas.

10

Tabla B

SEQ ID NO:	SECUENCIA (5' a 3')	Especificidad Tipo VPH
8	atgtgctgcc atatctactt ca	VPH tipo 16
9	cacagtctcc tgtacctggg ca	VPH tipo 18
10	taaaagtagt aattttaaag ag	VPH tipo 31
11	atgcacacaa gtaactagt	VPH tipo 33
12	ctgtgtgttc tgctgtgtc	VPH tipo 35
13	tccatacctt ctac	VPH tipo 39
14	cctactaagt ttaagcagta ta	VPH tipo 45
15	ttagcactgc cactgctgc	VPH tipo 51
16	aaaaaggaaa gcac	VPH tipo 52
17	ctacagaaca gttaagtaa	VPH tipo 56
18	atgcactgaa gtaa	VPH tipo 58
19	attcctaag tatacacacc tacc	VPH tipo 59
20	caatcaatac cttcgccatg tg	VPH tipo 66
21	ctttgtctac tactactga	VPH tipo 68

El conjunto de cebador y sonda comprende:

- 15 (a) tres cebadores directos que consisten en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o complementos de los mismos y dos cebadores inversos que consisten en: SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 o complementos de los mismos; y
- (c) catorce sondas que tienen una secuencia de: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21 o complementos de los mismos.
- 20

También se describen en la presente memoria cebadores para amplificar una secuencia de beta globina humana en una muestra de ensayo. Uno o más cebadores pueden ser un cebador que tiene una secuencia que comprende o que consiste en cualquiera de las secuencias mostradas a continuación en la Tabla C, un complemento de cualquiera de las secuencias mostradas a continuación en la Tabla C y cualquier combinación de las secuencias mostradas a continuación en la Tabla C y/o sus complementos.

Tabla C

SEQ ID NO:	SECUENCIA	Tipo de Cebador
6	ggcaggttg tatcaaggtt ac	Cebador Directo
7	cctaagggtg ggaaaataga cc	Cebador Inverso

También se describe en la presente memoria una sonda para detectar una secuencia de beta globina humana en una muestra de ensayo. La sonda tiene una secuencia que consiste en: actgggcatg tggagacaga (SEQ ID NO: 22) o su complemento.

El conjunto de cebadores para amplificar beta globina humana endógena en una muestra de ensayo comprende al menos dos cebadores seleccionados del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, un complemento del SEQ ID NO: 6 y un complemento del SEQ ID NO: 7. Preferiblemente, el conjunto de cebadores comprende el SEQ ID NO: 6 y el SEQ ID NO: 7.

También se describe en la presente memoria un conjunto de cebador y sonda para detectar beta-globina humana endógena en una muestra de ensayo que contiene uno o más de los cebadores descritos anteriormente en la Tabla C o uno de sus complementos y una sonda que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 22 o uno de sus complementos. Por ejemplo, el conjunto de cebador y sonda puede comprender:

- (a) al menos un cebador que tiene una secuencia del SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, un complemento del SEQ ID NO: 6 o un complemento del SEQ ID NO: 7; y
- (b) una sonda que tiene una secuencia del SEQ ID NO: 22 o uno de sus complementos.

Preferiblemente, el conjunto cebador y sonda comprende:

- (a) un cebador directo que tiene una secuencia del SEQ ID NO: 6 o uno de sus complementos y un cebador inverso que tiene una secuencia del SEQ ID NO: 7 o uno de sus complementos; y
- (b) una sonda que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 22 o uno de sus complementos.

Los cebadores y la sonda descritos anteriormente para la amplificación y detección de beta globina humana en una muestra de ensayo se pueden usar para generar amplicones de control interno (IC) en un análisis de VPH. La detección de beta globina humana en un análisis de VPH sirve como un control de validez de la muestra para la adecuación celular, la extracción de muestras y la eficacia de amplificación. Más específicamente, este control interno sirve para confirmar que cada muestra de ensayo tiene suficiente entrada de células para una detección precisa del VPH y que se ha procesado correctamente, e indica adicionalmente si están presentes inhibidores de la amplificación.

Los cebadores y sondas de la presente descripción se pueden preparar por cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica (Véanse, por ejemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 1989, 2. Sup. Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press: New York, NY; "PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications", 1990, M. A. Innis (Ed.), Academic Press: New York, NY; P. Tijssen "Hybridization with Nucleic Acid Probes Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Partes I and II)", 1993, Elsevier Science; "PCR Strategies", 1995, M. A. Innis (Ed.), Academic Press: New York, NY; y "Short Protocols in Molecular Biology", 2002, F. M. Ausubel (Ed.), 5. Supp. Ed., John Wiley & Sons: Secaucus, NJ). Por ejemplo, los cebadores y sondas descritos en la presente memoria se pueden preparar mediante síntesis química y polimerización basándose en un molde como describen, por ejemplo, Narang et al., en Meth. Enzymol., 1979, 68: 90-98; Brown et al., en Meth. Enzymol., 1979, 68: 109-151 y Belousov et al., en Nucleic Acids Res., 1997, 25: 3440-3444).

Por ejemplo, se pueden preparar cebadores y sondas utilizando un procedimiento automatizado en fase sólida basado en el enfoque con fosforamidita. En dicho método, cada nucleótido se añade individualmente al extremo 5' de una cadena de oligonucleótidos en crecimiento, la cual está unida en el extremo 3' a un soporte sólido. Los nucleótidos añadidos están en forma de 3'-fosforamiditas trivalentes que están protegidas por un grupo dimetoxitriilo (o DMT) en la posición 5'. Después del acoplamiento de fosforamidita inducido por base, la oxidación suave para proporcionar un intermedio fosfotriéster pentavalente y la eliminación de DMT proporcionan un nuevo sitio para la elongación del oligonucleótido. Después, se separan el cebador o la sonda del soporte sólido y los grupos amino

fosfodiéster y exocíclicos se desprotegen con hidróxido de amonio. Estas síntesis se pueden realizar en oligo sintetizadores tales como los comercialmente disponibles de Perkin Elmer/Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA), DuPont (Wilmington, DE) o Milligen (Bedford, MA). Alternativamente, los cebadores y sondas se pueden preparar a medida y pedir a partir de una diversidad de fuentes comerciales bien conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, Midland Certified Reagent Company (Midland, TX), ExpressGen, Inc. (Chicago, IL), Operon Technologies, Inc. (Huntsville, AL), BioSearch Technologies, Inc. (Novato, CA), y muchas otras.

La purificación de los cebadores y las sondas, cuando sea necesario o deseado, se puede llevar a cabo mediante cualquiera de una variedad de métodos bien conocidos en la técnica. La purificación de cebadores y sondas se puede realizar mediante electroforesis en gel de acrilamida nativa, mediante HPLC de intercambio aniónico como describen, por ejemplo, Pearson et al., en *J. Chrom.*, 1983, 255: 137 - 149 o mediante HPLC de fase inversa (Véase, McFarland et al., *Nucleic Acids Res.*, 1979, 7: 1067-1080).

La secuencia de los cebadores y las sondas se puede verificar utilizando cualquier método de secuenciación adecuado conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, degradación química (véase, Maxam et al., *Methods of Enzymology*, 1980, 65: 499-560), espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) (Véase, Pieles et al., *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21: 3191-3196), espectrometría de masas después de una combinación de digestión con fosfatasa alcalina y exonucleasa (Wu et al. *Anal. Biochem.*, 2001, 290: 347-352), y similares.

Además, los cebadores, sondas o cebadores y sondas de la presente descripción también pueden modificarse con un marcador detectable.

Como se ha mencionado anteriormente, en ciertas realizaciones de la presente invención, los cebadores, las sondas o tanto los cebadores como las sondas pueden marcarse con una marca o radical detectable antes de ser utilizados en los métodos de amplificación/detección. Preferiblemente, para su uso en los métodos descritos en la presente memoria, se marcan una o más sondas con un marcador o radical detectable. El papel de un marcador detectable es permitir la visualización y detección de secuencias diana amplificadas (p.ej., amplicones). Preferiblemente, el marcador detectable se selecciona de tal manera que genera una señal que puede medirse y cuya intensidad está relacionada (p.ej., es proporcional) a la cantidad de producto de amplificación en la muestra de ensayo que está siendo analizada.

La asociación entre una o más sondas y la marca detectable puede ser covalente o no covalente. Las sondas marcadas se pueden preparar por incorporación de, o conjugación a, un radical detectable. Las marcas pueden unirse directamente a la secuencia de ácido nucleico o indirectamente (p.ej., a través de un conector). Los conectores o brazos espaciadores de varias longitudes son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente, y pueden seleccionarse para reducir el impedimento estérico, o para conferir otras propiedades útiles o deseadas a las moléculas marcadas resultantes (Véase, por ejemplo, Mansfield et al., *Mol. Cell. Probes*, 1995, 9: 145-156).

Los métodos para marcar oligonucleótidos, tales como sondas, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Se pueden encontrar revisiones de protocolos de marcaje y técnicas de detección de marcas, por ejemplo en, L. J. Kricka, *Ann. Clin. Biochem.*, 2002, 39: 114-129; van Gijlswijk et al., *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2001, 1: 81-91; y Joos et al., *J. Biotechnol.*, 1994, 35: 135-153. Los métodos convencionales de marcaje de ácidos nucleicos incluyen: incorporación de agentes radiactivos, fijaciones directas de colorantes fluorescentes (véase, Smith et al., *Nucl. Acids Res.*, 1985, 13: 2399-2412) o de enzimas (Véase, Connolly et al., *Nucl. Acid. Res.*, 1985, 13: 4485-4502); modificaciones químicas de moléculas de ácido nucleico que las hacen detectables inmunoquímicamente o por otras reacciones de afinidad (Véanse, Broker et al., *Nucl. Acids Res.*, 1978, 5: 363-384; Bayer et al., *Methods of Biochem. Analysis*, 1980, 26: 1-45; Langer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78: 6633-6637; Richardson et al., *Nucl. Acids Res.*, 1983, 11: 6167-6184; Brigati et al., *Virology*, 1983, 126: 32-50; Tchen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81: 3466-3470; Landegent et al., *Exp. Cell Res.*, 1984, 15: 61-72; y A. H. Hopman et al., *Exp. Cell Res.*, 1987, 169: 357-368); y métodos de marcaje mediado por enzimas, tales como cebado aleatorio, traslación de muescas, PCR y formación de colas con transferasa terminal (para una revisión sobre marcaje enzimático, véase, por ejemplo, Tamsamani et al., *Mol. Biotechnol.*, 1996, 5: 223-232).

Puede utilizarse cualquiera de una amplia variedad de marcas detectables en la presente invención. Las marcas detectables adecuadas incluyen, pero no se limitan a, diversos ligandos, radionúclidos (p.ej., ^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{131}I , y similares); colorantes fluorescentes; agentes quimioluminiscentes (p.ej., ésteres de acridinio, dioxetanos estabilizados y similares); nanocristales de semiconductores fluorescentes inorgánicos específicamente solubles (p.ej., puntos cuánticos), nanopartículas metálicas (p.ej., oro, plata, cobre y platino) o "nanoagrupaciones"; enzimas (p.ej., peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcas colorimétricas (p.ej., colorantes, oro coloidal, y similares); marcas magnéticas (p.ej., DynabeadsTM); y están disponibles biotina, dioxigenina u otros haptenos y proteínas para antiseros o anticuerpos monoclonales.

En ciertas realizaciones, las sondas de detección de la invención se marcan fluorescentemente. Son adecuados numerosos radicales de marcaje fluorescente conocidos de una amplia variedad de estructuras químicas y características físicas para su uso en la práctica de esta invención. Los colorantes fluorescentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, colorantes Quasar® disponibles de Biosearch Technologies, Novato, CA), fluoresceína y colorantes de fluoresceína (p.ej., isotiocianina de fluoresceína o FITC, naftafluoresceína, 4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína, 6-carboxifluoresceínas (p.ej., FAM), VIC, NED, carbocianina, merocianina, colorantes de estirilo, colorantes de oxonol, ficoeritrina, eritrosina, eosina, colorantes de rodamina (p.ej., carboximetrametilrodamina o TAMRA, carboxi-rodamina 6G, carboxi-X-rodamina (ROX), lisamina rodamina B, Verde rodamina, Rojo rodamina, tetrametilrodamina o TMR), cumarina y colorantes de cumarina (p.ej., metoxicumarina, dialquilaminocumarina, hidroxycumarina y aminometilcumarina o AMCA), Colorantes Verde Oregon (p.ej., Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514), Texas Red, Texas Red-X, Spectrum Red™, Spectrum Green™, colorantes de cianina (p.ej. Cy-3™, Cy-5™), colorantes Alexa Fluor (p.ej., Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660 y Alexa Fluor 680), colorantes BODIPY (p.ej., BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR, BODIPY TR, BODIPY 530/550, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665), IRDyes (p.ej., IRD40, IRD 700, IRD 800), y similares. Los ejemplos de otros colorantes fluorescentes adecuados que se pueden utilizar y los métodos para conectar o incorporar colorantes fluorescentes a oligonucleótidos, tales como sondas, se pueden encontrar en RP Haugland, "The Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals", Publisher, Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg. (junio de 1992)). Los colorantes fluorescentes, así como kits de marcaje están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Amersham Biosciences, Inc. (Piscataway, N.J.), Molecular Probes Inc. (Eugene, OR), y New England Biolabs Inc. (Beverly, MA).

En lugar de ser directamente detectables, algunos grupos fluorescentes (donadores) transfieren energía a otro grupo fluorescente (aceptor) en un procedimiento de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET), y el segundo grupo produce la señal fluorescente detectable. En estas realizaciones, la sonda puede, por ejemplo, llegar a ser detectable cuando se hibrida con una secuencia diana amplificada. Los ejemplos de pares aceptor/donador de FRET adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína/tetrametilrodamina, IAEDANS/FITC, IAEDANS/5-(yodoacetamido)fluoresceína, B-ficoeritrina/Cy5 y EDANS/Dabcilo.

El uso de pares de moléculas de indicador/desactivador fluorescentes ligados físicamente está también dentro del alcance de la presente invención. El uso de tales sistemas en análisis TaqMan® (como se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.210.015; 5.804.375; 5.487.792 y 6.214.979) o como Balizas Moleculares (como describen, por ejemplo, Tyagi et al., en Nature Biotechnol., 1996, 14: 303-308; Tyagi et al., en Nature Biotechnol, 1998, 16: 49-53; Kostrikis et al., en Science, 1998, 279: 1228-1229; Sokol et al., en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 11538-11543; Marras et al., Genet. Anal., 1999, 14: 151-156; y las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.846.726, 5.925.517, 6.277.581 y 6.235.504) es bien conocido por los expertos en la técnica. Con el formato de ensayo TaqMan®, se pueden detectar productos de la reacción de amplificación a medida que se forman de una manera "en tiempo real". Como resultado, se forman híbridos producto de amplificación/sonda y se detectan mientras la mezcla de reacción se encuentra en condiciones de amplificación.

En algunas realizaciones de la presente invención, las sondas de detección de PCR son sondas de tipo TaqMan® que están marcadas en el extremo 5' con un radical fluorescente y en el extremo 3' con un radical desactivador. Los fluoróforos y desactivadores adecuados para su uso con sondas de tipo TaqMan® se describen en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.210.015; 5.804.375; 5.487.792; y 6.214.979; y el documento WO 01/86001. Los ejemplos de desactivadores incluyen, pero sin limitación, DABCYL (p.ej., éster succinimidílico de ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)-benzoico), ácido diarilrodaminocarboxílico, éster succinimidílico (o QSY-7) y ácido 4',5'-dinitrofluoresceíncarboxílico, éster succinimidílico (o QSY-33) (todos ellos disponibles de Molecular Probes (que forma parte de Invitrogen, Carlsbad, CA)), quencher1 (Q1, disponible en Epoch Biosciences, Bothell, WA) "Desactivadores Black Hole" (BHQ-1, BHQ-2, y BHQ-3 (disponibles de BioSearch Technologies, Inc., Novato, CA). En ciertas realizaciones, las sondas de detección de PCR son sondas de tipo TaqMan® que están marcadas en el extremo 5' con FAM y en el extremo 3' con Black Hole Quencher® o Black Hole Quencher® plus (ambos comercialmente disponibles de Biosearch Technologies, Novato, CA).

También se puede añadir una "cola" de nucleótidos normales o modificados a las sondas con fines de detectabilidad. Una segunda hibridación con ácido nucleico complementaria a la cola y que contiene una o más marcas detectables (tales como, por ejemplo, fluoróforos, enzimas o bases que han sido marcadas radiactivamente) permite la visualización de los híbridos de amplificación/sonda.

La selección de una técnica de marcaje particular dependerá de la situación y estará gobernada por varios factores, tales como la facilidad y el coste del método de marcaje, el espaciado espectral entre diferentes marcas detectables utilizadas, la calidad del marcaje de muestra deseado, los efectos del radical detectable sobre la reacción de hibridación (p.ej., sobre la velocidad y/o eficacia del procedimiento de hibridación), la naturaleza del método de amplificación utilizado, la naturaleza del sistema de detección, la naturaleza y la intensidad de la señal

generada por el marcador detectable, y similares.

C. Métodos de amplificación

5 El uso de conjuntos de cebadores de la presente invención para amplificar las secuencias diana de los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 y secuencias diana de beta globina humana no está limitado a ninguna técnica particular de amplificación de ácido nucleico ni a ninguna modificación particular de la misma. De hecho, los conjuntos de cebadores de la presente invención se pueden emplear en cualquiera de una variedad de métodos de amplificación de ácido nucleico que son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Kimmel et al., Methods Enzymol., 1987, 152: 307-316; Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 1989, 2.Supp. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: Nueva York, NY; "Short Protocols in Molecular Biology", F. M. Ausubel (Ed.), 2002, 5. Supp. Ed., John Wiley & Sons: Secaucus, NJ).

15 Tales métodos de amplificación de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se describe en una serie de referencias, tales como, pero sin limitarse a, "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", M. A. Innis (Ed.), 1990, Academic Press: Nueva York; "PCR Strategies", M. A. Innis (Ed.), 1995, Academic Press: Nueva York; "Polymerase chain reaction: basic principles and automation in PCR. A Practical Approach", McPherson et al. (Eds.), 1991, IRL Press: Oxford; Saiki et al., Nature, 1986, 324: 163; y las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.683.195, 4.683.202 y 4.889.818. También se incluyen las variaciones de la PCR, incluyendo los análisis basados en TaqMan® (Véase, Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1991, 88: 7276-7280) y la reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (o RT-PCR, descrita, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.322.770 y 5.310.652).

25 Generalmente, en la PCR, se agrega un par de cebadores a una muestra de ensayo obtenida de un sujeto (y por lo tanto en contacto con la muestra de ensayo) en exceso para hibridar con las cadenas complementarias del ácido nucleico diana. Los cebadores son extendidos cada uno por una ADN polimerasa utilizando la secuencia diana como molde. Los productos de extensión se convierten en dianas ellos mismos después de la disociación (desnaturalización) de la hebra diana original. Los nuevos cebadores se hibridan a continuación y son extendidos por la polimerasa, y se repite el ciclo para aumentar exponencialmente el número de copias de los amplicones. Los ejemplos de ADN polimerasas capaces de producir productos de extensión de cebadores en reacciones de PCR incluyen, pero no se limitan a, ADN polimerasa I *E coli*, fragmento de Klenow de ADN polimerasa I, ADN polimerasa de T4, ADN polimerasas termoestable aisladas de *Thermus aquaticus* (Taq), disponibles de una variedad de fuentes (p.ej., Perkin Elmer, Waltham, MA), *Thermus thermophilus* (USB Corporation, Cleveland, OH), *Bacillus stercorophilus* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), AmpliTaq Gold® Enzyme (Applied Biosystems, Foster City, CA), ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* recombinante (RTth) (Applied Biosystems, Foster City, CA) o *Thermococcus litoralis* (Polimerasa "Vent", New England Biolabs, Ipswich, MA). Las secuencias diana de ARN pueden amplificarse mediante transcripción inversa (RT) del ARNm a ADNc, y a continuación realizando la PCR (RT - PCR), como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, se puede usar una sola enzima para ambas etapas como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.322.770.

40 Además de los métodos de amplificación térmica enzimática descritos anteriormente, pueden emplearse reacciones de amplificación enzimática isotérmica para amplificar secuencias diana de VPH o beta globina utilizando cebadores y conjuntos de cebadores de la presente descripción (Andras et al., Mol. Biotechnol., 2001, 19: 29-44). Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, amplificación mediada por transcripción (TMA, la TMA es descrita por Kwoh et al., en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 1173-1177; Giachetti et al., J. Clin. Microbiol., 2002, 40: 2408-2419; y Patente de Estados Unidos Núm. 5.399.491); Replicación de Secuencia Autosostenida (3SR; la 3SR es descrita por Guatelli et al., en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87: 1874-1848; y Fahy et al., PCR Methods and Applications, 1991, 1: 25-33); Amplificación Basada en Secuencia de Ácido Nucleico (NASBA; la NASBA es descrita por Kievits et al., en J. Tirol. Methods, 1991, 35: 273-286; y la Patente de Estados Unidos Núm. 5.130.238) y la Amplificación por Desplazamiento de la Hebra (SDA; la SDA es descrito por Walker et al., en PNAS, 1992, 89: 392-396; EP 0 500 224 A2).

55 La amplificación por desplazamiento de la hebra combina la capacidad de una endonucleasa de restricción para cortar la cadena no modificada de su ADN diana y la acción de una ADN polimerasa deficiente en exonucleasa para extender el extremo 3' en la muesca y desplazar la cadena de ADN aguas abajo a una temperatura fija Véase, Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992). Los cebadores usados en la SDA incluyen un reconocimiento de endonucleasa de restricción en el sitio 5' de la secuencia de unión diana (véanse, las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.270.184 y 5.344.166).

60 La Amplificación Basada en la Secuencia de Ácido Nucleico (NASBA) utiliza tres enzimas (p.ej., ARNasa H, transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) y ARN polimerasa T7) trabajando en concierto a una temperatura isotérmica baja, generalmente 41°C. (Véanse, Compton, Nature, 1991, 350: 91-92; Chan et al., Rev. Med. Microbiol., 1999, 10: 185-196). El producto de una reacción de NASBA es principalmente ARN monocatenario.

La reacción de Replicación de Secuencia Autosostenida (3SR) es un método muy eficaz para la amplificación isotérmica de secuencias de ADN o ARN diana. Un sistema 3SR implica las actividades colectivas de la transcriptasa inversa de AMV, la ARNasa de *E. Coli* H, y la ARN polimerasa dependiente de ADN (p.ej., ARN polimerasa de T7).

La Amplificación Mediada por Transcripción (TMA) utiliza una ARN polimerasa para producir ARN a partir de un promotor manipulado en la región del cebador, una transcriptasa inversa para producir el ADN complementario a partir de los moldes de ARN y ARNasa H para retirar el ARN del ADNc (véase, Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990).

Los cebadores de NASBA, 3SR y TMA requieren un promotor de ARN polimerasa conectado a la secuencia de unión diana del cebador. Los promotores o secuencias promotoras para la incorporación en los cebadores son secuencias de ácido nucleico (ya sea de origen natural, producidas sintéticamente o un producto de un digesto de restricción) que son reconocidas específicamente por una ARN polimerasa que reconoce y se une a dicha secuencia e inicia el proceso de transcripción con lo que se generan transcritos de ARN. Los ejemplos de promotores útiles incluyen aquellos que son reconocidos por ciertas polimerasas de bacteriofagos tales como las del bacteriófago T3, T7 o SP6 o un promotor de *E coli*.

D. Métodos de detección

En ciertas realizaciones de la presente invención, las sondas descritas en la presente memoria se utilizan para detectar productos de amplificación generados por la reacción de amplificación. Las sondas descritas en la presente memoria se pueden emplear utilizando una diversidad de metodologías bien conocidas homogéneas o heterogéneas.

Los métodos de detección homogéneos incluyen, pero no se limitan a, el uso de marcas FRET que están ancladas a las sondas y que emiten una señal en presencia de la secuencia diana, Balizas Moleculares (véanse, Tyagi et al., Nature Biotechnol., 1996, 14: 303-308; Tyagi et al., Nature Biotechnol., 1998, 16: 49-53; Kostrikis et al., Science, 1998, 279: 1228-1229; Sokol et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 11538-11543; Marras et al., Genet. Anal., 1999, 14: 151-156; y las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.846.726, 5.925.517, 6.277.581 y 6.235.504), y los ensayos TaqMan® (véase, las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.210.015; 5.804.375; 5.487.792 y 6.214.979 y documento WO 01/86001). Utilizando estas técnicas de detección, los productos de la reacción de amplificación pueden detectarse a medida que se forman, a saber, en tiempo real. Como resultado, se forman híbridos de producto de amplificación/sonda y se detectan mientras la mezcla de reacción se encuentra en condiciones de amplificación.

En ciertas realizaciones, las sondas de la presente invención se utilizan en un ensayo TaqMan®. En un ensayo TaqMan®, el análisis se realiza junto con el ciclo térmico mediante el control de la generación de señales de fluorescencia. El sistema de ensayo tiene la capacidad de generar datos cuantitativos que permiten la determinación de números de copias diana. Por ejemplo, se pueden generar curvas convencionales utilizando diluciones seriadas de suspensiones previamente cuantificadas de uno o más tipos de VPH o secuencias de beta globina humana, frente a las cuales se pueden comparar muestras desconocidas. El ensayo TaqMan® se realiza convenientemente utilizando, por ejemplo, ADN polimerasa AmpliTaq Gold™, que tiene actividad de nucleasa 5' endógena, para digerir una sonda marcada con un colorante indicador fluorescente y un radical desactivador, como se ha descrito anteriormente. Los resultados del ensayo se obtienen midiendo los cambios en la fluorescencia que se producen durante el ciclo de amplificación a medida que la sonda es digerida, desacoplando los radicales fluorescentes y desactivadores y causando un aumento en la señal de fluorescencia que es proporcional a la amplificación de la secuencia diana.

Otros ejemplos de métodos de detección homogéneos incluyen ensayos de protección de hibridación (HPA). En tales ensayos, las sondas se marcan con éster de acridinio (AE), una molécula altamente quimioluminiscente (véanse, Weeks et al., Clin. Chem., 1983, 29: 1474-1479; Berry et al., Clin. Chem., 1988, 34: 2087-2090), utilizando una química de brazo conector no basado en nucleótidos (véanse, las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.585.481 y 5.185.439). La quimioluminiscencia se desencadena por hidrólisis de AE con peróxido de hidrógeno alcalino, que produce una N-metilacridona excitada que posteriormente se desactiva con la emisión de un fotón. En ausencia de una secuencia diana, la hidrólisis de AE es rápida. Sin embargo, la velocidad de hidrólisis de AE se reduce en gran medida cuando la sonda está unida a la secuencia diana. De este modo, las sondas marcadas con AE hibridadas y no hibridadas pueden detectarse directamente en solución sin necesidad de separación física.

Los sistemas de detección heterogéneos también son bien conocidos en la técnica y generalmente emplean un agente de captura para separar secuencias amplificadas de otros materiales en la mezcla de reacción. Los agentes de captura comprenden típicamente un material de soporte sólido (p.ej., pocillos de microtitulación, esferas, chips y similares) revestidos con una o más secuencias de unión específicas. Una secuencia de unión puede ser complementaria a una secuencia de cola añadida a las sondas oligonucleotídicas de la invención. Alternativamente,

una secuencia de unión puede ser complementaria a una secuencia de un oligonucleótido de captura, comprendiendo ella misma una secuencia complementaria a una secuencia de cola de una sonda. Después de la separación de los híbridos de producto de amplificación/sonda unidos a los agentes de captura de la mezcla de reacción restante, los híbridos de producto/sonda de amplificación pueden detectarse utilizando cualquier método de detección, tal como los descritos en la presente memoria.

E. Detección de VPH y beta globina humana en muestras de ensayo

En otra realización, la presente invención proporciona métodos para: (a) detectar la presencia de tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 en una muestra de ensayo; (b) detectar secuencias de beta globina humana en una muestra de ensayo; y (c) detectar la presencia de tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 y secuencias de beta globina humana en una muestra de ensayo.

Un sujeto del que se puede obtener una muestra de ensayo es cualquier mamífero. Preferiblemente, el mamífero incluye, pero no se limita a, perros, gatos, conejos, ratones, ratas, cabras, ovejas, vacas, cerdos, caballos, primates no humanos y seres humanos. La muestra de ensayo puede obtenerse del sujeto utilizando técnicas de rutina conocidas por los expertos en la técnica. Preferiblemente, la muestra de ensayo contiene o se sospecha que contiene: (i) al menos uno de los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 y (ii) al menos una secuencia de beta globina humana.

Después de que se obtiene la muestra de ensayo de un sujeto, la muestra de ensayo se pone en contacto con cebadores (y opcionalmente una o más sondas) de al menos uno de los conjuntos de cebadores o conjuntos de cebadores y sondas descritos en la presente memoria para formar una mezcla de reacción. La mezcla de reacción se coloca a continuación en condiciones de amplificación. Los cebadores se hibridan con cualquier ácido nucleico de VPH y cualquier ácido nucleico de beta globina humana en la muestra de ensayo. El ácido nucleico de VPH o de beta globina humana presente en la muestra se amplifica y se genera al menos un producto de amplificación (es decir, al menos una secuencia diana).

Se detecta al menos un producto de amplificación detectando la hibridación entre al menos un producto de amplificación y al menos una de las sondas de la presente invención (tal como una o más sondas del cebador y conjuntos de sondas descritos en la presente memoria). Específicamente, la detección de al menos un producto de amplificación con una o más de las sondas que consisten en el SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21 o uno de sus complementos indica la presencia de al menos uno de los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 en la muestra de ensayo. La detección de hibridación del producto de amplificación y la sonda que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 22 o uno de sus complementos indica la presencia de una secuencia de beta globina humana en la muestra de ensayo. Preferiblemente, los métodos de la presente invención implican la detección de al menos uno de los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y una secuencia de beta globina humana (añadida como control) en la muestra de ensayo. Lo más preferiblemente, la detección de al menos un tipo de VPH y la secuencia de beta globina humana se realizan simultáneamente.

Adicionalmente, los métodos de la presente invención también pueden usarse para genotipificar parcialmente (p.ej., diferenciar) el tipo de VPH presente y detectado en una muestra de ensayo. Por ejemplo, cada una de las sondas utilizadas en los métodos descritos en la presente memoria puede marcarse con un marcador detectable diferente que emite un color de luz diferente para facilitar la identificación de diferentes tipos de VPH presentes en una muestra de ensayo. Preferiblemente, sin embargo, para su uso en los métodos de la presente invención, se marca una sonda que consiste en el SEQ ID NO: 8 con un primer marcador detectable que emite un color único (p.ej., rojo) y se marca una sonda que consiste en el SEQ ID NO: 9 con una segunda marca detectable que es diferente de la primera marca detectable y que también emite un color único (p.ej., verde). Cada una de las sondas que consta de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21 o uno de sus complementos que se utilizará en el método junto con SEQ ID NO: 8 y 9 podría marcarse con la misma marca detectable (es decir, cada una se marcaría con una tercera marca detectable que emitiría un tercer color único (p.ej., amarillo)). De este modo, el empleo de diferentes tipos de marcadores con las diferentes sondas de VPH descritas en la presente memoria (véase la Tabla B) permite no sólo detectar la presencia de VPH en una muestra de ensayo sino también identificar específicamente los tipos específicos presentes en la muestra. La detección y/o diferenciación de los tipos de VPH 16 y 18 (usando sondas que consisten en la SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9) en una muestra de ensayo es útil e importante porque estos dos tipos de VPH causan al menos 70% de Los cánceres cervicales.

F. Kits

En otra realización, la presente invención proporciona kits que comprenden materiales y reactivos útiles para la detección de tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 y beta globina humana de acuerdo

con los procedimientos descritos en la presente memoria. Los kits pueden ser utilizados por laboratorios de diagnóstico, laboratorios experimentales o profesionales. En ciertas realizaciones, los kits comprenden los conjuntos de cebadores y sondas descritos en la Sección B de la presente memoria y opcionalmente, reactivos de amplificación. Cada kit comprende preferiblemente reactivos de amplificación para un método de amplificación específico. Por lo tanto, un kit adaptado para su uso con NASBA contiene preferiblemente cebadores con un promotor de ARN polimerasa conectado a la secuencia de unión diana, mientras que un kit adaptado para uso con SDA contiene preferiblemente cebadores que incluyen un sitio 5' de reconocimiento de endonucleasa de restricción a la secuencia de unión diana. De manera similar, cuando el kit está adaptado para su uso en un ensayo de nucleasa 5', tal como el ensayo TaqMan®, las sondas de la presente descripción pueden contener al menos un radical indicador fluorescente y al menos un radical desactivador.

Los reactivos de amplificación adecuados incluyen adicionalmente, por ejemplo, uno o más de: tampones, reactivos, enzimas que tienen actividad de transcriptasa inversa y/o actividad de polimerasa o exonucleasa, cofactores enzimáticos tales como magnesio o manganeso; sales; desoxinucleótido trifosfato (dNTP) adecuados para llevar a cabo la reacción de amplificación. Por ejemplo, un kit, adaptado para su uso con NASBA, puede contener cantidades adecuadas de transcriptasa inversa, ARNasa H y ARN polimerasa de T7. En kits adaptados para reacciones de amplificación de la transcripción, tales como NASBA, se pueden incluir tampones que contienen, por ejemplo, DMSO, que se sabe que mejora la reacción de amplificación.

Dependiendo del procedimiento, los kits pueden comprender adicionalmente uno o más de: tampones de lavado, tampones de hibridación, tampones de marcaje, medios de detección y otros reactivos. Los tampones y/o reactivos se optimizan preferiblemente para la técnica de amplificación/detección concreta a la que está destinado el kit. También se pueden incluir en el kit protocolos para usar estos tampones y reactivos para realizar diferentes etapas del procedimiento.

Además, se pueden proporcionar kits con un control interno como control de la eficacia de amplificación, para evitar la aparición de resultados de ensayo falsos negativos debido a fallos en la amplificación, para verificar la adecuación celular, extracción de muestras, etc. Se selecciona una secuencia de control interno óptima de tal manera que no compita con la secuencia de ácido nucleico diana en la reacción de amplificación. Preferiblemente, el control interno comprende los cebadores de la beta globina (es decir, al menos uno de los SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, un complemento del SEQ ID NO: 6 o un complemento del SEQ ID NO: 7) y una sonda (a saber, SEQ ID NO: 22 o un complemento del SEQ ID NO: 22) descrito anteriormente en la presente en la Sección B.

Los kits también pueden contener reactivos para el aislamiento de ácidos nucleicos de muestras de ensayo previo a la amplificación antes de la extracción de ácido nucleico.

Los reactivos pueden suministrarse en una forma sólida (p.ej., liofilizada) o líquida. Los kits de la presente invención pueden comprender opcionalmente diferentes recipientes (p.ej., un vial, una ampolla, un tubo de ensayo, un matraz o una botella) para cada tampón y/o reactivo individuales. Cada componente será generalmente apropiado como alícuota en su recipiente respectivo o proporcionado en una forma concentrada. También pueden proporcionarse otros recipientes adecuados para llevar a cabo ciertas etapas del ensayo de amplificación/detección. Los recipientes individuales se mantienen preferentemente en estrecho confinamiento para la venta comercial.

Los kits también pueden comprender instrucciones para usar los reactivos de amplificación y los conjuntos de cebadores o de cebador y sonda descritos en la presente memoria: para procesar la muestra de ensayo, extraer moléculas de ácido nucleico y/o realizar la prueba; y para interpretar los resultados obtenidos, así como un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental. Tales instrucciones opcionalmente pueden estar en forma impresa o en CD, DVD u otro formato de soporte grabado.

A modo de ejemplo, y no de limitación, se proporcionarán ahora ejemplos de las presentes descripciones.

Ejemplo 1 Materiales y métodos

A. Diseño de cebadores y sondas de VPH y beta-globina

Todos los oligonucleótidos utilizados en los Ejemplos 2-6 se sintetizaron utilizando una metodología de síntesis de oligonucleótidos convencional conocida por los expertos en la técnica. Todas las sondas son oligonucleótidos monocatenarios marcados utilizando técnicas rutinarias conocidas en la técnica, con un fluoróforo en el extremo 5' y un radical desactivador en el extremo 3'. La etiqueta 5' es VIC (este colorante marcador de color verde se utilizó para marcar la sonda específica para VPH 16 (a saber, SEQ ID NO: 8, véase la Tabla B en la Sección B)), NED (esta marca de color amarillo se utilizó para marcar la sonda específica para VPH 18 (a saber, SEQ ID NO: 9, véase la Tabla B en la Sección B)), FAM (este colorante marcador de color azul se utilizó para marcar las sondas específicas de VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ó 68 (SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID

NO: 20 y SEQ ID NO: 21, véase la Tabla B en la Sección B)) o Quasar (para beta globina humana; SEQ ID NO: 22). La marca 3' es Black Hole Quencher (BHQ), tal como BHQ1-dT (utilizada para marcar las sondas específicas para VPH 16, 31, 33, 35, 45, 51, 56, 59, 66 ó 68; Sección B), BHQ2-dT (utilizada para marcar la sonda específica para VPH18, véase la Tabla B en la Sección B), beta globina humana (SEQ ID NO: 22) o BHQ1 plus (utilizada para marcar la sonda específica para VPH 39, 52 ó 58. Véase la Tabla B en la Sección B).

B. PCR en tiempo real

Se extrajo el ADN de VPH, se concentró y se purificó a partir de las muestras utilizando tecnología de micropartículas magnéticas que captura ácidos nucleicos y lava las partículas para eliminar los componentes de muestra no unidos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.234.809). Los ácidos nucleicos unidos se eluyeron y se prepararon para la amplificación. Se utilizó una mezcla de cebadores de VPH de 3 cebadores directos (a saber, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, véase Tabla A en la Sección B) y 2 cebadores inversos (a saber, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5; véase la Tabla A en la Sección B) dirigida a una región L1 conservada para amplificar las dianas de VPH. Los 3 cebadores directos (SEQ ID NOS: 1-3) y los 2 cebadores inversos (SEQ ID NOS 4-5) se denominan colectivamente en la presente memoria "Mezcla de Cebadores de VPH". Se generó una señal para catorce (14) genotipos humanos de VPH (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) con sondas específicas de genotipo SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21; Véase la Tabla B en la Sección B). Todas estas catorce sondas se denominan colectivamente en la presente memoria "Conjunto de Sondas de VPH". La diana de beta globina humana se amplificó con un conjunto de cebadores (SEQ ID NOS: 6 y 7) dirigido a una secuencia endógena de beta globina humana y se detectó con la sonda de beta globina (SEQ ID NO: 22). Además de los cebadores y sondas, la reacción PCR consistió en: 14 unidades de enzima AmpliTaq Gold, cloruro de magnesio 7 mM (como reactivo de activación) y otros reactivos de amplificación (que contenían dNTP 0,6 mM, colorante de referencia ROX 73,5 nM en tampón Tris).

La amplificación/detección en tiempo real se llevó a cabo en un Abbott *m2000Rt* (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL) utilizando las siguientes condiciones de ciclos: 1 ciclo a 92°C 10 minutos; 4 ciclos a 91°C 30 segundos y 54°C 30 segundos; 38 ciclos a 91°C 30 segundos, 52°C 30 segundos (con 1 segundo por ciclo de auto-extensión) y 50°C 40 segundos. Las mediciones de fluorescencia se registraron durante la etapa de lectura (50°C) de los 38 ciclos.

Ejemplo 2: Inclusión de genotipos y genotipificación parcial

En este ejemplo, se sometieron a ensayo, individualmente y combinadas, cincuenta y una (51) muestras que contenían dianas de ADN de VPH de cada uno de los 14 genotipos utilizando la Mezcla de Cebadores de VPH y el Conjunto de Sondas de VPH del Ejemplo 1. La PCR en tiempo real se realizó como se describe en el Ejemplo 1. Cada diana de ADN de VPH se sometió a ensayo a una concentración de 400.000 copias por reacción. Como se muestra a continuación en la Tabla 1, los resultados de las 51 muestras incluyeron 14 muestras con un único genotipo, 25 muestras con dos genotipos y 12 muestras con tres genotipos. Como también se muestra en la Tabla 1, estos resultados fueron referidos con precisión y se determinó con precisión la presencia o ausencia de ADN de VPH 16 y VPH 18 en cada caso. Este ejemplo demuestra la capacidad de la Mezcla de Cebadores de VPH única y del Conjunto de Sondas de VPH para detectar 14 genotipos de VPH HR (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, y 68) y para distinguir el VPH 16 y el VPH 18 de los otros 12 genotipos de VPH HR.

Tabla 1

Núm. de muestra	Genotipo de VPH	Resultado
1	16	VPH 16
2	18	VPH 18
3	31	Otro VPH HR
4	33	Otro VPH HR
5	35	Otro VPH HR
6	39	Otro VPH HR
7	45	Otro VPH HR
8	51	Otro VPH HR
9	52	Otro VPH HR
10	56	Otro VPH HR

ES 2 628 432 T3

Núm. de muestra	Genotipo de VPH	Resultado
11	58	Otro VPH HR
12	59	Otro VPH HR
13	66	Otro VPH HR
14	68	Otro VPH HR
15	16+18	VPH 16; VPH 18
16	16+31	VPH 16; Otro VPH HR
17	16+33	VPH 16; Otro VPH HR
18	16+35	VPH 16; Otro VPH HR
19	16+39	VPH 16; Otro VPH HR
20	16+45	VPH 16; Otro VPH HR
21	16+51	VPH 16; Otro VPH HR
22	16+52	VPH 16; Otro VPH HR
23	16+56	VPH 16; Otro VPH HR
24	16+58	VPH 16; Otro VPH HR
25	16+59	VPH 16; Otro VPH HR
26	16+66	VPH 16; Otro VPH HR
27	16+68	VPH 16; Otro VPH HR
28	18+31	VPH 18; Otro VPH HR
29	18+33	VPH 18; Otro VPH HR
30	18+35	VPH 18; Otro VPH HR
31	18+39	VPH 18; Otro VPH HR
32	18+45	VPH 18; Otro VPH HR
33	18+51	VPH 18; Otro VPH HR
34	18+52	VPH 18; Otro VPH HR
35	18+56	VPH 18; Otro VPH HR
36	18+58	VPH 18; Otro VPH HR
37	18+59	VPH 18; Otro VPH HR
38	18+66	VPH 18; Otro VPH HR
39	18+68	VPH 18; Otro VPH HR
40	16+18+31	VPH 16; VPH 18; Otro VPH HR
41	16+18+33	VPH 16; VPH 18; Otro VPH HR
42	16+18+35	VPH 16; VPH 18; Otro VPH HR
43	16+18+39	VPH 16; VPH 18; Otro VPH HR
44	16+18+45	VPH 16; VPH 18; Otro VPH HR
45	16+18+51	VPH 16; VPH 18; Otro VPH HR
46	16+18+52	VPH 16; VPH 18; Otro VPH HR
47	16+18+56	VPH 16; VPH 18; Otro VPH HR
48	16+18+58	VPH 16; VPH 18; Otro VPH HR
49	16+18+59	VPH 16; VPH 18; Otro VPH HR

Núm. de muestra	Genotipo de VPH	Resultado
50	16+18+66	VPH 16; VPH 18; Otro VPH HR
51	16+18+68	VPH 16; VPH 18; Otro VPH HR

Ejemplo 3: Especificidad de hibridación de la sonda

5 Se utilizaron dos estudios para demostrar la especificidad de hibridación del Conjunto de Sondas de VPH descrito en el ejemplo 1. La PCR en tiempo real se realizó como se describe en el Ejemplo 1 con sondas de VPH HR individuales (véase la Tabla 2) o un cóctel que contenía las 14 sondas de VPH HR (véase la Tabla 3), en presencia de las dianas individuales de ADN plasmídico de VPH a una concentración de aproximadamente 10.000.000 copias por reacción. Los resultados de los dos estudios mostrados en las Tablas 2 y 3 demuestran la especificidad de las sondas de VPH seleccionadas,

10

Tabla 2

Diana	Sonda →	16	18	31	33	35	39	45	51	52	56	58	59	66	68
HR	16 (SEQ ID NO: 8)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HR	18 (SEQ ID NO: 9)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HR	31 (SEQ ID NO: 10)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HR	33 (SEQ ID NO: 11)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HR	35 (SEQ ID NO: 12)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HR	39 (SEQ ID NO: 13)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
HR	45 (SEQ ID NO: 14)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
HR	51 (SEQ ID NO: 15)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
HR	52 (SEQ ID NO: 16)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
HR	56 (SEQ ID NO: 17)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
HR	58 (SEQ ID NO: 18)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
HR	59 (SEQ ID NO: 19)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
HR	66 (SEQ ID NO: 20)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
HR	68 (SEQ ID NO: 21)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LR ²	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LR	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LR	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LR	43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LR	44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: "+" indica VPH HR Detectado; "-" indica No detectado.

¹ Alto riesgo (HR)

² Bajo riesgo (LR)

Tabla 3

	Diana	Resultado
LR	6	No detectado
LR	11	No detectado
LR	13	No detectado
LR	26	No detectado
LR	30	No detectado

	Diana	Resultado
LR	32	No detectado
LR	40	No detectado
LR	42	No detectado
LR	43	No detectado
LR	44	No detectado
LR	53	No detectado
LR	54	No detectado
LR	55	No detectado
LR	57	No detectado
LR	61	No detectado

Ejemplo 4 Detección de Beta Globina como control de adecuación celular

5 Para que la beta globina humana sirva como un control de adecuación celular, la señal de la beta globina, como en el número de ciclos (CN) obtenido a partir del análisis de un resultado de PCR en tiempo real, debería ser indicativa de la cantidad de entrada de células de especímenes clínicos.

10 Se realizó un estudio para evaluar la correlación entre la cantidad de células introducidas a partir de una línea celular positiva de VPH cultivada y la señal de beta globina. La correlación entre la señal de beta globina y la cantidad de células introducidas se muestra en la Figura 1. El estudio demuestra que el aumento de la concentración de las células introducidas se correlaciona con una mayor eficiencia de detección de beta globina, como se muestra por el CN anterior.

15 Además, se realizó un estudio separado para evaluar la distribución en CN de beta globina en muestras clínicas. Se analizó una población de 1206 especímenes cervicales de pacientes recogidos en Solución PreservCyt® (Cytoc Corporation, Marlborough, MA) y se muestra en la Figura 2. El cuantil de 25%, 50% y 75% de la población tiene un CN de beta globina de 21,29, 22,41 y 23,78, respectivamente, con un CN mínimo de 17,47 y un CN máximo de 36,01. Este estudio demuestra cómo la beta globina puede servir como un control de adecuación celular.

20 Los cebadores y sonda de beta globina humana como se describe en el Ejemplo 1 se emplearon en la PCR en Tiempo Real para generar los resultados mostrados en las Figuras 1 y 2.

Ejemplo 5: Rendimiento analítico de los diseños de cebador y sonda

25 Este ejemplo describe los resultados de dos estudios. El primer estudio demostró el rendimiento analítico mejorado de la Mezcla de Cebadores de VPH del Ejemplo 1 cuando se comparó con los cebadores GP5+/GP6+ consenso habituales (cebador GP5+: 5'-TTTGTACTGTGGTAGATACTAC-3' (SEQ ID NO: 23). cebador GP6+: 5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3' (SEQ ID NO: 24)). Este estudio se llevó a cabo utilizando PCR en Tiempo Real como se describe en el Ejemplo 1. El rendimiento entre la Mezcla de Cebadores de VPH única de la presente invención y los cebadores GP5+/GP6+ consenso se evaluó utilizando valores CN. Los resultados se muestran en la Tabla 4 y las Figuras 3A-3D. Se observó mejoría en el rendimiento (valor de mejora del CN > 1) para 10/13 genotipos de VPH (Tabla 4). Se observó una mejora importante para los genotipos de VPH 39, 51, 52 y 68 (valor de mejora de CN > 10) y se muestra en las Figuras 3A-3D.

35

Tabla 4

Genotipo de VPH	SEC ID NO: 1-5	Cebadores GP5+/6 + (SEQ ID NOS: 23-24)	Mejora de CN de las Secuencias Reivindicadas
16	14,67	14,62	-0,1
18	11,84	11,80	0,0
31	14,45	22,05	7,6
33	15,58	15,03	-0,6
35	11,92	13,36	1,4

Genotipo de VPH	SEC ID NO: 1-5	Cebadores GP5+/6 + (SEQ ID NOS: 23-24)	Mejora de CN de las Secuencias Reivindicadas
39	15,14	28,44	13,3
45	12,74	15,32	2,6
51	11,47	26,37	14,9
52	13,89	32,25	18,4
56	14,95	19,44	4,5
58	16,86	18,30	1,4
59	11,55	18,26	6,7
68	13,29	28,41	15,1

* Los valores positivos indican una mayor eficiencia de amplificación en PCR en tiempo real para las secuencias reivindicadas.

5 El segundo estudio examinó el rendimiento analítico de varias de las sondas únicas de la presente invención específicas para los tipos de VPH 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 58 y 59 (SEQ ID NO: 8-10, 12 -16 y 18-19) en comparación con las secuencias de las sondas para los mismos tipos de VPH descritas en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.265.154 B1 (Véase la Tabla 5). Las sondas de la Patente de Estados Unidos Núm. 6.265.154 se marcaron como se describe en el Ejemplo 1 con el fin de permitir una comparación directa cuando se sometieron a ensayo en la PCR en tiempo real. El rendimiento se evaluó utilizando valores de CN y señales de fluorescencia. Los resultados se muestran en la Tabla 6, la Tabla 7 y las Figuras 4A-4E. Se observó mejoría en los rendimientos (valor de mejora del CN > 1 y señal de fluorescencia > 0,1) para 5/10 genotipos de VPH (Tabla 6 y Tabla 7). Se observó una mejoría significativa en las señales de CN y fluorescencia para los genotipos de VPH 16, 18, 31, 52 y 59 y se muestra en las Figuras 4A - 4E.

Tabla 5

SEQ ID NO. de la Patente de Estados Unidos Núm. 6.265.154	Especificidad del VPH
4	16
7	18
10	31
16	35
19	39
22	45
25	51
28	52
34	58/33
37	59

15

Tabla 6			
Genotipo de VPH	Secuencias de la presente invención	Secuencia en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.265.154	Mejora de CN de las Secuencias Reivindicadas*
16	14,59 (SEQ ID NO: 8)	17,59 (SEQ ID NO: 4)	3,0
18	11,84 (SEQ ID NO: 9)	16,88 (SEQ ID NO: 7)	5,0
31	14,45 (SEQ ID NO: 10)	16,79 (SEQ ID NO: 10)	2,3
35	11,92 (SEQ ID NO: 12)	11,99 (SEQ ID NO: 16)	0,1
39	15,14 (SEQ ID NO: 13)	15,57 (SEQ ID NO: 19)	0,4
45	12,74 (SEQ ID NO: 14)	13,36 (SEQ ID NO: 22)	0,6
51	11,47 (SEQ ID NO: 15)	10,71 (SEQ ID NO: 25)	-0,8

Genotipo de VPH	Secuencias de la presente invención	Secuencia en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.265.154	Mejora de CN de las Secuencias Reivindicadas*
52	13,89 (SEQ ID NO: 16)	14,99 (SEQ ID NO: 28)	1,1
58	16,86 (SEQ ID NO: 18)	16,25 (SEQ ID NO: 34)	-0,6
59	11,55 (SEQ ID NO: 19)	18,69 (SEQ ID NO: 37)	7,1

* Los valores positivos indican una mayor eficacia de detección en la PCR en tiempo real de las secuencias reivindicadas.

Tabla 7

Genotipo de VPH	Secuencias de la presente invención	Secuencia en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.265.154	Mejora de la señal de fluorescencia de la secuencia reclamada
16	0,153 (SEQ ID NO: 8)	00,028 (SEQ ID NO: 4)	0,125
18	0,265 (SEQ ID NO: 9)	0,062 (SEQ ID NO: 7)	0,203
31	0,235 (SEQ ID NO: 10)	0,051 (SEQ ID NO: 10)	0,184
35	0,220 (SEQ ID NO: 12)	0,280 (SEQ ID NO: 16)	-0,060
39	0,301 (SEQ ID NO: 13)	0,522 (SEQ ID NO: 19)	-0,221
45	0,234 (SEQ ID NO: 14)	0,279 (SEQ ID NO: 22)	-0,045
51	0,317 (SEQ ID NO: 15)	0,295 (SEQ ID NO: 25)	0,022
52	0,316 (SEQ ID NO: 16)	0,103 (SEQ ID NO: 28)	0,213
58	0,365 (SEQ ID NO: 18)	0,469 (SEQ ID NO: 34)	-0,104
59	0,204 (SEQ ID NO: 19)	0,088 (SEQ ID NO: 37)	0,116

Ejemplo 6: Rendimiento clínico del cebador y las sondas de la presente invención

5 La sensibilidad y especificidad de un análisis utilizando la Mezcla de Cebadores de VPH y el Conjunto de Sondas de VPH como se describe en el Ejemplo 1 para la detección de VPH HR se evaluaron sometiendo a ensayo 441 especímenes cervicales de pacientes recogidos en Solución Preset-vCyt® (Cytoc Corporation, Marlborough, MA). El estado de VPH de alto riesgo de los especímenes cervicales se determinó por medio de la concordancia entre el análisis Abbott RealTime HR HPV (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) y el ensayo de ADN de VPH High-Risk hc2 ("HC2") (comercialmente disponible en Qiagen, Inc., Valencia, CA) y por análisis adicional de especímenes con resultados discordantes utilizando el Ensayo de Genotipificación LINEAR ARRAY HPV (comercialmente disponible de Roche Diagnostics, Basilea, CH, "Linear Array"). Los tres análisis o ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se detectaron un total de 227 especímenes mediante ambos análisis y 179 no fueron detectados por ninguno de los dos análisis. Los resultados de 35 especímenes discordantes fueron resueltos mediante Linear Array. De los 238 especímenes positivos, 231 fueron detectados por el análisis Abbott RealTime HR HPV y 234 fueron detectados por HC2. De los 203 especímenes negativos resueltos, 203 no fueron detectados por el análisis de VPH HR Abbott Real-Time y 179 no fueron detectados por HC2. Como se muestra a continuación en la Tabla 8, la sensibilidad del análisis Abbott RealTime HR HPV para la detección de VPH HR fue de 97% y del análisis HC2 fue de 98%. La especificidad del análisis Abbott RealTime HR HPV fue de 100% y del análisis HC2 fue de 88%.

Tabla 8

Ensayo	Sensibilidad	Especificidad
Abbott RealTime HR HPV	97%	100%
HC2	98%	88%

25 Un experto en la técnica comprenderá fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los términos y ventajas mencionados, así como los inherentes a los mismos. Los complejos moleculares y los métodos, procedimientos, tratamientos, moléculas, compuestos específicos descritos en la presente memoria son actualmente representativos de realizaciones preferidas, son ilustrativos y no se pretende que sean limitaciones del alcance de la invención. Será fácilmente evidente para un experto en la técnica que se pueden hacer variaciones de sustitución y modificaciones a la invención descrita en la presente memoria sin apartarse del alcance y el espíritu de la invención.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas de los niveles de los expertos en la técnica a los que pertenece la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Abravaya, Klara
Erickson, Brian
Huang, Shihai
Mak, Wai-Bing
- 10 Salituro, John
Tang Ning
- <120> Cebadores y sondas para la detección de secuencias de virus del papiloma humano y de beta globina humana en muestras de ensayo
- 15 <130> 9628USO1
- <160> 24
- 20 <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
<211> 25
<212> ADN
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Sintetizada químicamente
- 30 <400> 1
tatttggtac tgtggtgat actac 25
- <210> 2
<211> 29
<212> ADN
- 35 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Sintetizada químicamente
- 40 <400> 2
caattgtttg ttactgttgt ggatactac 29
- <210> 3
<211> 25
<212> ADN
- 45 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Sintetizada químicamente
- 50 <400> 3
ttttattac ctgtgtgat actac 25
- <210> 4
<211> 28
<212> ADN
- 55 <213> Secuencia artificial
- 60 <220>
<223> Sintetizada químicamente
- <400> 4
gaaaaataaa ctgtaaatca tattcctc 28

<210> 5
 <211> 28
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

 10 <400> 5
 gaaaaataaa tgcaattca tactctc 28

 <210> 6
 <211> 22
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintetizada químicamente
 20
 <400> 6
 ggcagggttg tatcaaggtt ac 22

 <210> 7
 25 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Sintetizada químicamente

 <400> 7
 cctaagggtg ggaaaataga cc 22

 35 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

 <400> 8
 45 Atgtgctgcc atatctactt ca 22

 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

 <400> 9
 55 Cacagtctcc tgtacctggg ca 22
 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

 <400> 10

taaaagtagt aatttaaag ag 22
 <210> 11
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintetizada químicamente
 10 <400> 11
 atgcacacaa gtaactagt 19
 <210> 12
 15 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Sintetizada químicamente
 <400> 12
 ctgtgtgttc tgctgtgc 19
 25 <210> 13
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Sintetizada químicamente
 <400> 13
 35 tccatacctt ctac 14
 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sintetizada químicamente
 <400> 14
 45 cctactaagt ttaagcagta ta 22
 <210> 15
 <211> 19
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintetizada químicamente
 55 <400> 15
 ttagcactgc cactgctgc 19
 <210> 16
 <211> 14
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 16
 aaaaaggaaa gcac 14

5 <210> 17
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 17
 ctacagaaca gtaagtaa 19

15 <210> 18
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 18
 atgcactgaa gtaa 14

25 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 19
 attcctaag tatacacacc tacc 24

35 <210> 20
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 20
 caatcaatac ctcgccatg tg 22

45 <210> 21
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 21
 ctttgctac tactactga 19

55 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Sintetizada químicamente
 <400> 22
 actgggcatg tggagacaga 20
 5
 <210> 23
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sintetizada químicamente
 <400> 23
 15 tttgttactg tggtagatac tac 23
 <210> 24
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintetizada químicamente
 25 <400> 24
 gaaaaataaa ctgtaaatca tattc 25

REIVINDICACIONES

1. Un conjunto de cebador y sonda para detectar tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 en una muestra de ensayo, en donde el conjunto de cebador y sonda comprende:
- 5 (a) tres cebadores directos que consisten en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o sus complementos y dos cebadores inversos que consisten en: SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 o sus complementos; y
- 10 (b) catorce sondas que consisten en: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21 o sus complementos.
2. Un método para detectar uno o más tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 en una muestra de ensayo, en donde el método comprende:
- 15 (a) poner en contacto la muestra de ensayo con tres cebadores directos que consisten en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o sus complementos y dos cebadores inversos que consisten en: SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 o sus complementos en condiciones de amplificación para generar una primera secuencia diana; y
- 20 (b) detectar la hibridación entre la primera secuencia diana y al menos una sonda como una indicación de la presencia de uno o más tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 en la muestra de ensayo, en donde la sonda consiste en: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21 o sus complementos.
- 25 3. El método de la reivindicación 2, en donde al menos una sonda está marcada con una marca detectable.
4. El método de la reivindicación 3, en donde la marca detectable comprende un radical fluorescente anclado al extremo 5' de al menos una sonda.
- 30 5. El método de la reivindicación 4, en donde al menos una sonda comprende adicionalmente un radical desactivador anclado en su extremo 3'.
6. El método de la reivindicación 2, que comprende adicionalmente:
- 35 (a) poner en contacto la muestra de ensayo con un cebador directo que consiste en SEQ ID NO: 6 o uno de sus complementos y un cebador inverso que consiste en el SEQ ID NO: 7 o uno de sus complementos en condiciones de amplificación para generar una segunda secuencia diana; y
- 40 (b) detectar hibridación entre la segunda secuencia diana y una sonda que consiste en el SEQ ID NO: 22 o uno de sus complementos como una indicación de la presencia de una beta globina humana en la muestra de ensayo.
7. El método de la reivindicación 2, en donde el método detecta los tipos de VPH 16, 18 ó 16 y 18, y en la presente memoria en la etapa (b) se detecta una hibridación entre la primera secuencia diana y la siguiente:
- 45 (i) una primera sonda que consiste en el SEQ ID NO: 8 o uno de sus complementos como una indicación de la presencia de VPH tipo 16, en donde dicha primera sonda está marcada con un primer marcador detectable; y
- 50 (ii) una segunda sonda que consiste en el SEQ ID NO: 9 o uno de sus complementos como una indicación de la presencia de VPH tipo 18, en donde dicha segunda sonda está marcada con una segunda marca detectable y adicionalmente en donde la segunda marca detectable es una marca detectable diferente de la primera marca detectable.
8. El método de la reivindicación 7, que comprende adicionalmente detectar la hibridación entre la primera secuencia diana y una o más sondas adicionales que consisten en: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21 o uno de sus complementos como una indicación de la presencia de tipos de VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 u 68, en donde cada una de las una o más sondas adicionales está marcada con una tercera marca detectable idéntica y adicionalmente en donde dicha tercera marca detectable es una marca detectable diferente de la primera marca detectable y la segunda marca detectable.
- 60 9. Un kit de cebador y sonda para detectar tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 en una muestra de ensayo, en donde dicho kit comprende

ES 2 628 432 T3

- (a) tres cebadores directos que consisten en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 o sus complementos y dos cebadores inversos que consisten en: SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 o sus complementos; y
- 5 (b) catorce sondas que consisten en: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21 o sus complementos; y
- (c) reactivos de amplificación.
10. El kit de cebador y sonda de la reivindicación 9, en donde el kit comprende adicionalmente un cebador directo que consiste en el SEQ ID NO: 6 o uno de sus complementos y un cebador inverso que consiste en el SEQ ID NO: 7 o uno de sus complementos y una sonda que consiste en el SEQ ID NO: 22 o uno de sus complementos para detectar beta-globina humana en la muestra de ensayo.

FIGURA 1

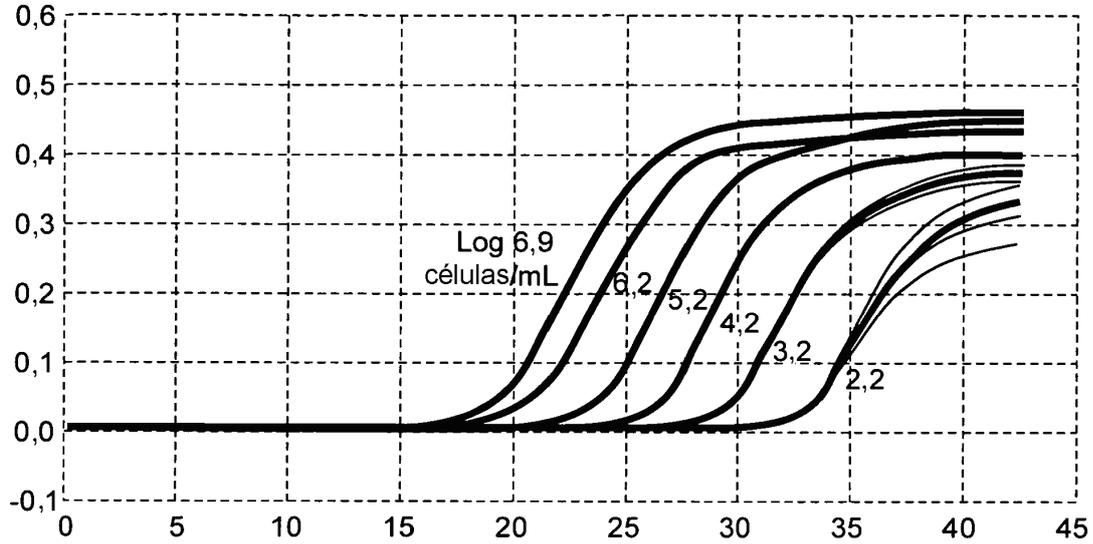


FIGURA 2

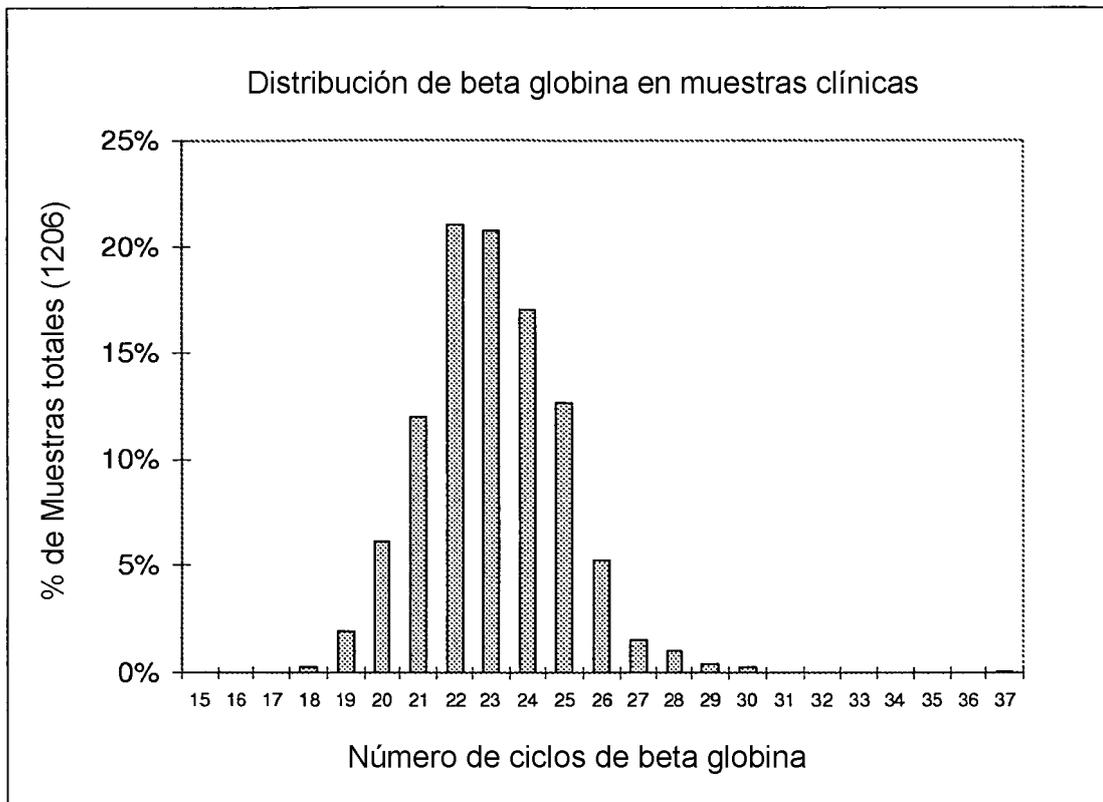


FIGURA 3A

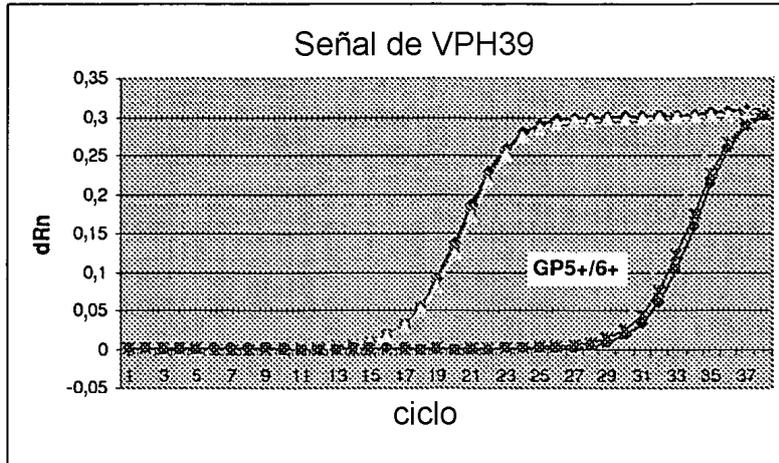


FIGURA 3B

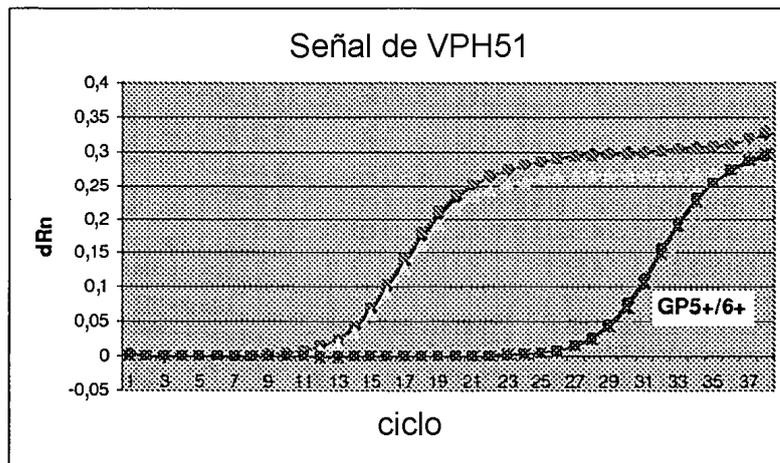


FIGURA 3C

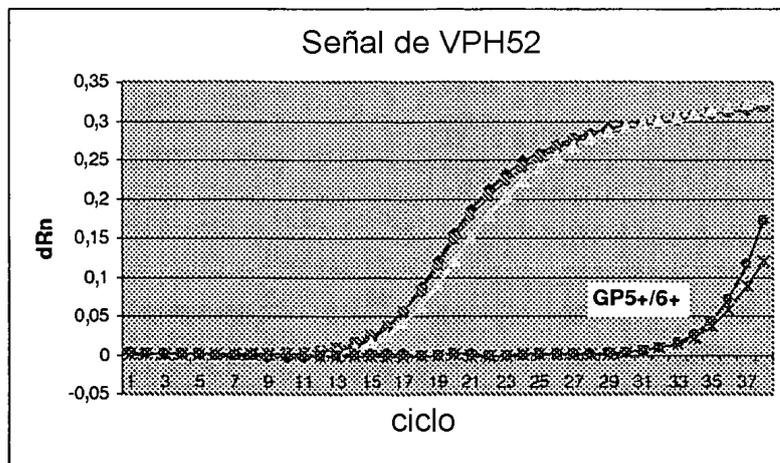


FIGURA 3D

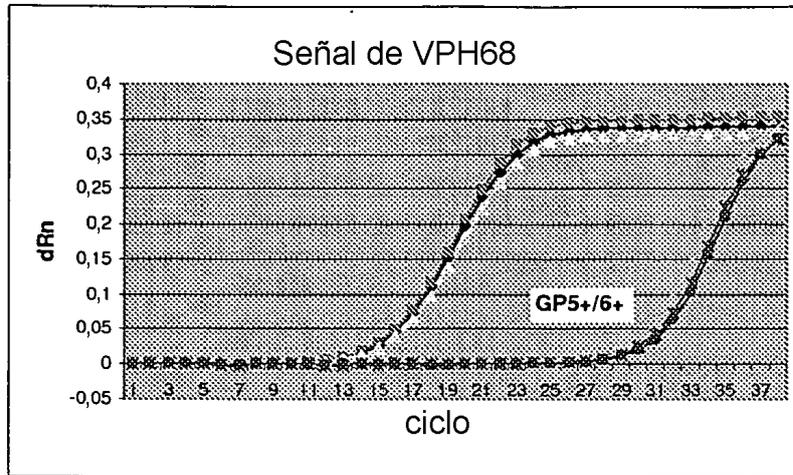


FIGURA 4A

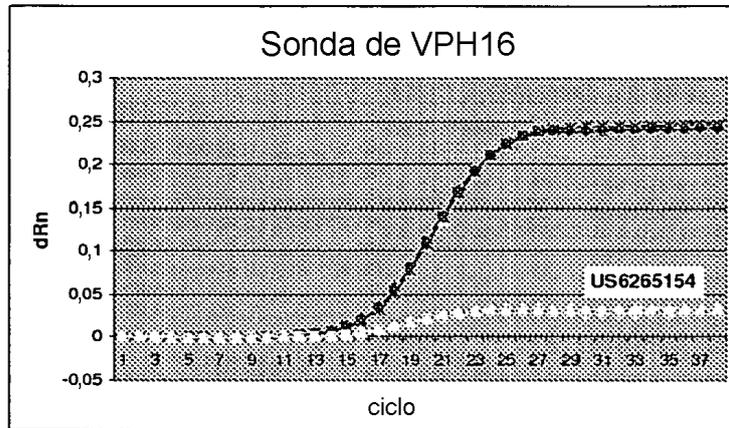


FIGURA 4B

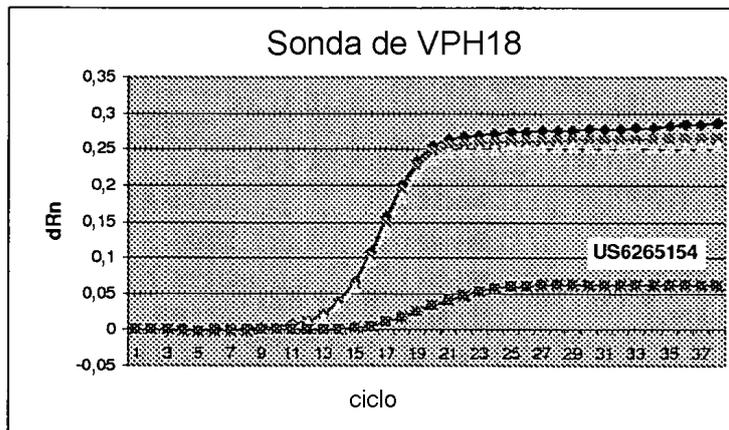


FIGURA 4C

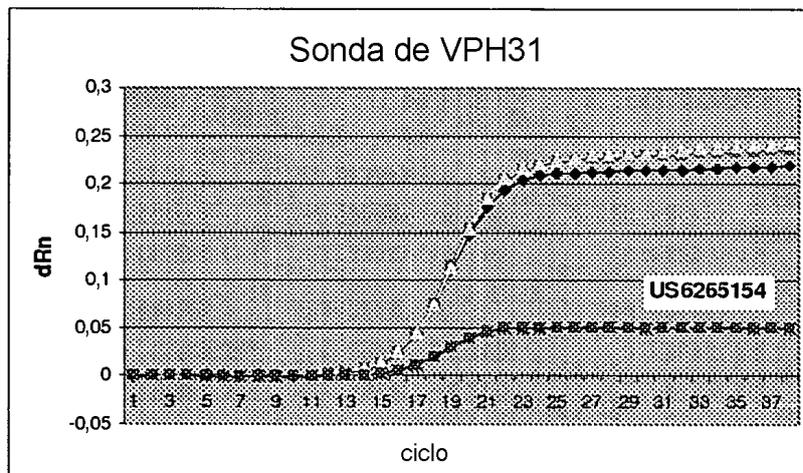


FIGURA 4D

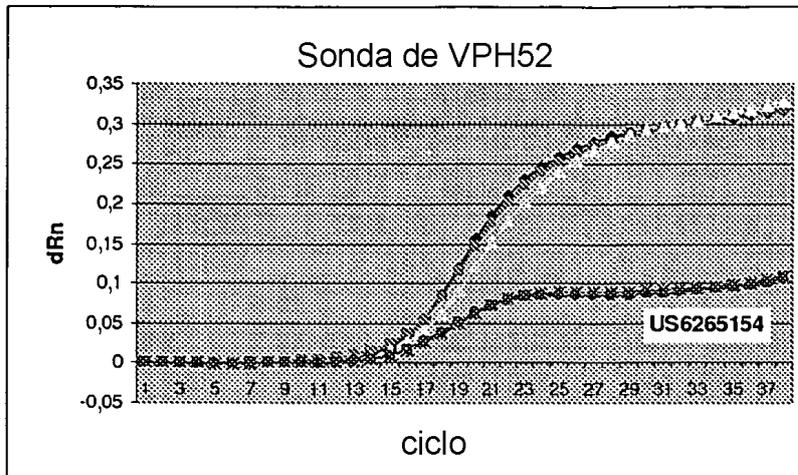


FIGURA 4E

