

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 839**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2012 PCT/US2012/042365**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12174187**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2012 E 12801310 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2643460**

54 Título: **Procedimiento, composiciones y kits para determinar el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)**

30 Prioridad:

15.06.2011 US 201161497234 P

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

30.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WRONSKA, DANUTA;
SCHOUEST, KATHERINE y
TREMLETT, LESLIE**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 644 839 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

Procedimiento, composiciones y kits para determinar el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

5 **SECTOR DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere al VIH y comprende procedimientos, composiciones y kits para detectar el mismo.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10 El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un virus genéticamente diverso debido a la mutación frecuente en su material genético. Existen dos genotipos principales y se designan como 1 y 2. El VIH de tipo 1 (VIH-1) es el más predominante en todo el mundo y se divide en grupos y subtipos, de los cuales el grupo M, subtipo B es el más común. En los Estados Unidos, otros subtipos comunes del grupo M del VIH-1 son: A, C, D, F, y G. Además, ocurren recombinaciones genéticas de estos subtipos de forma natural creando formas recombinantes circulantes del virus (VIH FRCs). Las dos FRCs más comunes son CRF01 (AE) y CRF02 (AG). Se cree que el VIH-1 del grupo O es menos común que el grupo M y que el VIH-2 es escaso.

20 Un enfoque comúnmente utilizado para lograr la detección de variantes genéticas múltiples es diseñar sondas a partir de regiones genómicas que se conservan o, si eso no es posible, diseñar sondas múltiples, cada una con una especificidad diferente. Sin embargo, este último enfoque puede disminuir la sensibilidad del ensayo.

25 La capacidad de un análisis biológico para detectar una amplia gama de variantes genéticas del patógeno se define como especificidad. Los análisis con una elevada especificidad pueden detectar un gran número de variantes genéticas en una sola prueba y, por lo tanto, son deseados ya que ofrecen un elevado nivel de seguridad patogénica y ahorro de costes. La sensibilidad del análisis se define como la concentración más baja de un patógeno que puede ser detectada por unidad de muestra y, a menudo, se expresa numéricamente como LOD (límite de detección). Mientras menor sea el LOD, más sensible es el análisis. A menudo, se considera que la sensibilidad y especificidad del análisis son exclusivas, ya que puede ser difícil de desarrollar un análisis biológico que tenga alta sensibilidad y especificidad.

30 Por lo tanto, aún existe la necesidad de disponer de composiciones y procedimientos para detectar el VIH.

35 **RESUMEN DE LA INVENCION**

En el presente documento se da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos, o un complemento de la misma, tal como se indica en:

40 5'-agg ccc tgc atg tac tgg gtg-3' (SEQ ID NO:1);
 5'-agg tcc tgc ctg tac tgg atg-3' (SEQ ID NO:2);
 5'-agg ccc tgc ctg ctg tgg atg-3' (SEQ ID NO:3);
 5'-agg tcc tgc atg cac tgg atg-3' (SEQ ID NO:4);
 5'-agg ccc tgc atg tac tgg atg-3' (SEQ ID NO:5); o
 5'-tcc ctt atc tgc cct ggt ggt aac gg-3' (SEQ ID NO:6).

45 En el presente documento da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos, tal como se indica en:

50 5'-agg pcc tgc mtg pwc tgg atg-3' (SEQ ID NO:7);

en la que p = un nucleótido universal; m = a o c; y w = a o t.

55 En el presente documento también da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos, tal como se indica en:

5'-agg pnn tgn atg pan tgg atg-3' (SEQ ID NO:8); o
 5'-agg pnn tgn ntg ptn tgg atg-3' (SEQ ID NO:9);

60 en la que p = un nucleótido universal y n = una citidina o un análogo de citidina que tiene una modificación en C-5.

La presente invención da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos, tal como se indica en:

65 5'-agg pnn tgn atg pan tgg atg-3' (SEQ ID NO:10); o
 5'-agg pnn tgn ntg ptn tgg atg-3' (SEQ ID NO:11);

en la que p = un nucleótido universal y n = un análogo de citidina que tiene una modificación en C-5.

En el presente documento se da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos, tal como se indica en:

5
 5'-agg pcc tgc atg pac tgg atg-3' (SEQ ID NO:12); o
 5'-agg pcc tgc ctg ptc tgg atg-3' (SEQ ID NO:13);

en la que p = un nucleótido universal.

10
 En el presente documento también da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos, tal como se indica en:

15
 5'- gac atc aag cag cca tgc aaa t -3' (SEQ ID NO:14);
 5'-agt agt tcc tgc tat gtc act tc-3' (SEQ ID NO:15);
 5'- gag gac atc aag ggg ctt tac a -3' (SEQ ID NO:16);
 5'- cag caa tgt cac ttc ctg ttg -3' (SEQ ID NO:17);
 5'- ggc aga ggt agt gcc ag -3' (SEQ ID NO:18);
 5'- ggt cgc cca cac aat taa gc-3' (SEQ ID NO:19);
 20
 5'- agg cac tct cag aag gct gca cg-3' (SEQ ID NO:20);
 5'-acc atc aat gag gaa gct gca gaa tgg gat-3' (SEQ ID NO:21); o
 5'-tcc ctt atc tgc cct ggt ggt aac gg-3' (SEQ ID NO:22).

25
 La presente invención también da a conocer una composición que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de la presente invención, en la cual la composición comprende además un primer cebador directo que tiene una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:14 y un primer cebador inverso que tiene una secuencia tal como se establece en SEQ ID NO:15, en la que el primer cebador directo y el primer cebador inverso cada uno son capaces de hibridizarse con una secuencia diana bajo unas condiciones de PCR, para amplificar así la secuencia diana. En una realización de la presente invención la composición también comprende: una sonda de oligonucleótido que tiene una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:6, un segundo cebador directo que tiene una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:16 y un segundo cebador inverso que tiene una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:17.

35
 En el presente documento también da a conocer un procedimiento para aplicar una secuencia diana. El procedimiento comprende poner en contacto una composición con la secuencia diana bajo unas condiciones de PCR, en la cual la composición comprende un primer oligonucleótido que tiene una secuencia tal como se indica en (SEQ ID NO:10) y un segundo oligonucleótido que tiene una secuencia tal como se indica en (SEQ ID NO:11), en la que p = un nucleótido universal y n = un análogo de citidina que tiene una modificación en C-5, en la que la composición además comprende un primer cebador directo que tiene una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:14 y un primer cebador inverso que tiene una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:15, en la que el primer cebador directo y el primer cebador inverso cada uno son capaces de hibridizarse con una secuencia diana bajo unas condiciones de PCR, para amplificar así la secuencia diana.

45
 En otro aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para determinar un VIH en una muestra. El procedimiento comprende:

- 50
 (a) llevar a cabo una PCR con un ácido nucleico de plantilla en la muestra utilizando un cebador directo que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:14 y un cebador inverso que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:15; y
 (b) poner en contacto un amplicón generado por los cebadores directo e inverso con un primer oligonucleótido que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:10 y un segundo oligonucleótido que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:11, en el que la detección del amplicón es indicativa de la presencia del VIH en la muestra.

55
 En otros aspectos adicionales, la presente invención da a conocer un kit que comprende las composiciones y/o la una o más moléculas de ácido nucleico de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

60
 En el presente documento se proporciona, una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se indica en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:5, o SEQ ID NO:6, o un complemento de las mismas.

65
 En el presente documento también se da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se indica en SEQ ID NO:7, en la que p = un nucleótido universal; m = a o c; y w = a o t.

En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se indica en SEQ ID NO:8 o 9, en la que p = un nucleótido universal y n = una citidina o un análogo de citidina que tiene una modificación en C-5.

- 5 La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se indica en SEQ ID NO:10 u 11, en la que p = un nucleótido universal y n = un análogo de citidina que tiene una modificación en C-5.

10 Además, el presente documento da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se indica en SEQ ID NO:12 ó 13, en la que p = un nucleótido universal.

En una realización, el nucleótido universal es 3-nitropirrol, 2'-deoxinucleósido y 5-nitroindol. En otras realizaciones, el nucleótido universal es 6H, 8H-3, 4-dihidropirimido[4,5-c][1,2]oxazin-7-ona.

- 15 En otras realizaciones, el análogo de citidina que tiene la modificación en C-5 es un C-5-propino o análogo metilado de dC. Por ejemplo, en realizaciones preferentes, el análogo de citidina que tiene la modificación en C-5 es un análogo de C-5-propino de dC (por ejemplo, [5-(1-propinil)-2'-deoxiCitidina (pdC)].

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

25 En otra realización, la presente invención da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que consiste o esencialmente consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende: SEQ ID NOs: 10-11.

30 El término "molécula de ácido nucleico" en el presente documento incluye polímeros compuestos de bases nucleotídicas de origen natural, azúcares y enlaces internucleósidos (esqueleto) covalentes, así como moléculas de ácidos nucleicos que tienen partes de origen no natural que funcionan de forma similar. Además, el término "molécula de ácido nucleico" también incluye polímeros que son de cadena doble, de cadena simple, que comprenden ARN, ADN, ARN o ADN modificados, ARN o ADN miméticos o cualquier combinación de los mismos.

35 En algunas realizaciones, los cebadores y sondas de oligonucleótidos pueden derivarse de secuencias de ácidos nucleicos que se dan a conocer en el presente documento. En varias realizaciones, los cebadores y sondas se utilizan en combinación unas con otras. La presente invención tiene su aplicación en una variedad de diferentes aplicaciones entre las que se incluyen, sin constituir limitación, aplicaciones de investigación, médicas y de diagnóstico del VIH. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico pueden proporcionar reactivos para utilizar, por ejemplo, en un ensayo o kit de detección de VIH, expandiendo de esta manera el repertorio de variantes de VIH que pueden detectarse mediante el ensayo o kit.

40 Generalmente, una sonda es un oligonucleótido que es complementario o sustancialmente complementario a una secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico diana. Las sondas son útiles para una variedad de aplicaciones entre las que se incluyen, sin constituir limitación, detectar o capturar el ácido nucleico diana o un amplicón correspondiente a la diana. Por ejemplo, pueden ser diseñadas sondas adecuadas para utilizar en los procedimientos de detección basados en la amplificación a partir de cualquier secuencia ubicada en la secuencia de un producto de amplificación que podría prepararse utilizando dos cebadores seleccionados y/o que comprende la misma.

50 La sonda puede comprender la secuencia de nucleótidos tal como se indica en SEQ ID NOs:1-22, o un complemento de la misma.

En una realización, la sonda comprende la SEQ ID NO:6, o un complemento de la misma.

55 En otra realización, la sonda comprende las SEQ ID NO:10 ó 11, en las que p = un nucleótido universal y n = un análogo de citidina que tiene una modificación en C-5. En una realización, p es 6H, 8H-3, 4-dihidropirimido[4,5-c][1,2]oxazin-7-ona; y n es [5-(1-propinil)-2'-deoxyCytidina (pdC)].

60 Un experto en la materia reconocerá que las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención, incluyendo cebadores y/o sondas, se pueden obtener mediante técnicas de biología molecular estándares descritas en *Current Protocols in Molecular Biology* (1999. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, editors. John Wiley & Sons, Inc.) o mediante síntesis química o mediante análogos de ácidos nucleicos. Los procedimientos que implican síntesis química pueden estar automatizados y disponibles comercialmente y pueden incluir, por ejemplo, procedimientos de fosfodiéster, fosfotriéster o fosforamidita. Las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.458.066; 4.415.732 y *Meth. Enzymol.* 1979 68:90 y 109, dan a conocer ejemplos de procedimientos de síntesis química. La síntesis química de ácidos nucleicos permite la incorporación de bases no naturales o modificadas, así como una variedad de fracciones de marcaje, en una molécula de ácido

nucleico. Además, las modificaciones químicas del esqueleto tales como enlaces peptídicos, fosforotioatos, fosforoamidatos, fosfotriésteres, 2'-O-Metil ARN, 2'-O-Mt ARN, P-Etoxi ADN y P-Etoxi 2'-O-Mt ARN están fácilmente disponibles y son conocidas en la técnica. Además, la utilización de sondas reticulables en la hibridación de ácidos nucleicos para reticular secuencias diana también es conocida en la técnica. Por ejemplo, se describen

- 5 compuestos basados en furocumarina o psoraleno unidos a moléculas de ácido nucleico mediante la formación de aductos en las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.826.967 y 5.082.934, las cuales refieren a un análogo de nucleósido fotoactivable que comprende una fracción de cumarina enlazada mediante su anillo fenilo a la posición 1 de una fracción de azúcar ribosa o desoxiribosa en ausencia de participación de una fracción de base.
- 10 Los análogos y miméticos de ácidos nucleicos tienen estructuras químicas similares que las moléculas de ácidos nucleicos nativos pero con modificaciones únicas. Los análogos de ácidos nucleicos, tales como ácidos nucleicos bloqueados (LNAs), ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) y morfolinos, mejoran las capacidades de las moléculas de ácidos nucleicos tradicionales más allá de las limitaciones asociadas con la química de los ácidos nucleicos estándares (Karkare S y Bhatnagar D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006 71:575-586.) Dichos análogos de ácidos
- 15 nucleicos expanden y mejoran mucho las capacidades para detectar e identificar secuencias de ácidos nucleicos relacionadas.

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

20 En una realización, el uno o más nucleótidos heterólogos comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia de bases de una sonda de purificación. La sonda de purificación puede estar unida a soportes sólidos tales como, por ejemplo, una matriz o partículas libres en solución. Entre los ejemplos no limitativos de un soporte sólido se encuentran nitrocelulosa, nailon, vidrio, poliacrilato, mezcla de polímeros, poliestireno, silano polipropileno y partículas con atracción magnética. Por ejemplo, la sonda de purificación, que puede comprender una secuencia de ADN o ARN, puede marcarse con amina o biotina a través de un reticulador. Estas sondas de purificación marcadas con biotina o amina se pueden someter a continuación a estrategias de inmovilización y detección que permiten las interacciones *in vitro* ácido nucleico:ácido nucleico o proteína:ácido nucleico. De esta manera, la hibridación del segmento heterólogo de la molécula de ácido nucleico aislada con secuencia de bases

25 complementaria de la sonda de purificación puede facilitar la purificación de la muestra de moléculas que se hibridizan con el segmento de secuencia específico del virus de la molécula de ácido nucleico aislada. La Patente de Estados Unidos Núm. 6.534.273, describe un procedimiento para capturar una molécula de ácido nucleico diana en una muestra sobre un soporte sólido.

30 En una realización, las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención están unidas a un soporte sólido, tales como los descritos anteriormente.

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

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

40 En otras realizaciones, el uno o más nucleótidos heterólogos comprende una secuencia de control unida de forma funcional. En una realización, la secuencia de control es una secuencia potenciadora o promotora que es reconocida específicamente por una ARN polimerasa que se une a dicha secuencia e inicia la transcripción para producir transcriptos de ARN. Entre los ejemplos no limitativos de promotores reconocidos por una ARN polimerasa se incluyen promotores tales como T3, T7 o SP6. De esta manera, una molécula de ácido nucleico aislada se puede utilizar en una variedad de ensayos en base a ácidos nucleicos incluyendo ensayos que utilizan una ARN polimerasa para producir transcriptos de ARN múltiples tales como, por ejemplo, el ensayo de amplificación

mediada por transcripción (TMA) tal como se describe en *Nature* 350:91-92 (1991); y en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.399.491.

5 En una realización, las secuencias de ácidos nucleicos aisladas de la presente invención se marcan, por ejemplo, se marcan de forma radioactiva, de forma quimioluminiscente, de forma fluorescente, de forma fosforescente o con colorantes infrarrojos o con un marcaje Raman de superficie amplificada o partículas de resonancia de plasmón (PRP). Por ejemplo, entre las modificaciones de los nucleótidos se incluyen la adición de acridina o derivados de la misma, Acrydite™, amina, biotina, BHQ-1™, BHQ-2™, BHQ-3™, borano dNTPs, espaciadores de carbono (por ejemplo, C₃, C₆, C₇, C₉, C₁₂ o C₁₈), cascade blue, colesterol, cumarina o derivados de los mismos, Cy3[®], Cy3.5[®],
10 Cy5[®], Cy5.5[®], Cy7[®] DABCYL, dansilcloruro, digoxigenina, dinitrofenilo, biotina dual, EDANS, 6-FAM, fluoresceína, 3'-glicerilo, HEX, IAEDANS, dA invertido, dG invertido, dC invertido, dG invertido, IRD-700, IRD-800, JOE, La Jolla Blue, aglomerados metálicos tales como nanopartículas de oro, ácido fenilborónico, fosfato psoraleno, 3'- o 5'-fosforilación, pireno, 3' ribo-adenosina, 3' ribo-guanosina, 3' ribo-citidina, (LC)Red640, (LC)Red705, rodamina, ROX, tiol (SH), espaciadores, TAMRA, TET, AMCA-S[®], SE, BODIPY[®], Marina Blue[®], Oregon Careen[®], Pacific Blue[®],
15 QSY7™, Rhodamine Careen[®], Rhodamine Red[®], Rhodol Careen[®], tetrametilrodamina, Texas Red[®], Uni-Link NH₂-modificador, radiomarcajes (por ejemplo, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³H) y nanopartículas. Una variedad de técnicas de marcaje son conocidas por un experto en la materia.

20 El marcaje se puede realizar directamente o indirectamente a la molécula de ácido nucleico aislada. El marcaje de un ácido nucleico se puede llevar a cabo mediante la unión de forma covalente de un grupo detectable (marca) ya sea a una posición interna o terminal, por ejemplo. Un experto en la materia conoce que existen una variedad de maneras para derivatizar oligonucleótidos con funcionalidades reactivas que permiten la adición de una marca. Existen varios enfoques para unir directamente las marcas a las moléculas de ácidos nucleicos y para biotinilar sondas de manera radioactiva, fluorescente, quimioluminiscente, enzimática o se pueden enlazar marcar densas en
25 electrones a través de la avidina. Entre los ejemplos no limitativos de referencias que describen marcas y procedimientos de marcaje de ácidos nucleicos se incluyen la Patente de Estados Unidos Núm. 4.605.735; la Patente de Estados Unidos Núm. 4.757.141; la Patente de Estados Unidos Núm. 6.965.020; *Nucl. Acids Res.* 5:363 (1978); *Nucl. Acids Res.* 13:1529 (1985); *Nucl. Acids Res.* 15:3131 (1987); *Nucl. Acids Res.* 15:6455 (1987); *Nucl. Acids Res.* 13:4485 (1985); *Nucl. Acids Res.* 15:4837 (1987); y *Anal. Biochem.* 169:1-25 (1988), que dan a conocer divulgación en referencia al marcaje de ácidos nucleicos.
30

En algunas realizaciones, las moléculas de ácidos nucleicos aisladas se marcan para procedimientos de detección que utilizan transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET). FRET implica el uso de dos colorantes, un colorante donador y uno aceptador. FRET se puede detectar ya sea por fluorescencia del colorante aceptador ("fluorescencia sensibilizada") si dicho aceptador por sí mismo es fluorescente, o por disminución de la fluorescencia del colorante donador si dicho aceptador es un colorante inhibidor no fluorescente. FRET se puede demorar si el colorante donador libera su fluorescencia en el tiempo. Este proceso se denomina "TR-FRET" o "FRET de tiempo resolutivo". Los colorantes donador y aceptador también pueden ser los mismos, en cuyo caso FRET se detecta mediante la despolarización de la fluorescencia resultante. Los colorantes también pueden estar
40 acoplados de forma covalente para formar un colorante fluorescente de tándem o colorante de tándem o conjugado de tándem. Por ejemplo, un único colorante donador es entonces capaz de excitar dos colorantes aceptores de forma simultánea, provocando la emisión de luz de múltiples longitudes de onda. Preferentemente, el perfil de longitudes de onda de emisión del donador, como mínimo parcialmente, debe superponerse con el perfil de longitudes de onda de absorción del aceptador.
45

Entre los colorantes fluorescentes que se pueden emplear se incluyen, sin constituir limitación, Quasar[®] (por ejemplo, Quasar[®] 670), BODIPY FL, Cy3[®], Cy3.5[®], Cy5.RTM., Cy5.5[®], EDANS, FAM, fluoresceína, HEX, IAEDANS, JOE, Oregon Careen[®], (LC)Red640, (LC)Red705, ROX, TAMRA, TET, tetrametilrodamina y Texas Red[®].

50 Quasar[®] 670 (Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA) es una indocarbocianina que fluoresce en la región del rojo del espectro visible.

Entre los colorantes inhibidores se incluyen, sin constituir limitación, BHQ-1™, BHQ-2™, BHQ-3™, DABCYL, aglomerados metálicos tales como nanopartículas de oro y QSY7™.
55

Entre los pares donador/aceptador que se pueden utilizar se incluyen, sin constituir limitación, FAM/BHQ-1, Quasar[®]/BHQ-2, TET/BHQ-1, JOE/BHQ-1, HEX/BHQ-1, Oregon Green/BHQ-1, TAMRA/BHQ-2, ROX/BHQ-2, Cy3/BHQ-2, Cy3.5/BHQ-2, Texas Red/BHQ-2, Texas Red/BHQ-2, Cy5/BHQ-3, Cy5.5/BHQ-3 fluoresceína/tetrametilrodamina, fluoresceína/fluoresceína, fluoresceína/QSY7, fluoresceína/LC RED640, fluoresceína/LC Red705 IAEDANS/fluoresceína, EDANS/DABCYL y BODIPY FLI/BODIPY FL.
60

En una realización, la presente invención da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se indica en SEQ ID NO: 10 ó 11, en la que la molécula de ácido nucleico comprende además una marca detectable.
65

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

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

En otras realizaciones, el par donador/aceptador es Quasar 670/BHQ-2.

5 También se da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se indica en (SEQ ID NO:6), o un complemento de las mismas, en la que la molécula de ácido nucleico comprende Quasar 670 en el extremo 5' y BHQ-2 en el extremo 3'.

10 En una realización, la presente invención da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se indica en (SEQ ID NO:10) o (SEQ ID NO:11), en las que p es 6H, 8H-3, 4-dihidropirimido[4,5-c][1,2]oxazin-7-ona y n es [5-(1-propinil)-2'-deoxiCytidina (pdC), en la que la molécula de ácido nucleico comprende FAM en el extremo 5' y BHQ-1 en el extremo 3'.

15 En otras realizaciones, las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención pueden proporcionar una utilización simultánea de dos o más sondas utilizando la transferencia de energía donador/aceptador en la que, por ejemplo, se preparan balizas moleculares que poseen fluoróforos coloreados de forma diferente, permitiendo que el ensayo a llevar a cabo detecte de forma simultánea diferentes dianas en la misma reacción. Por ejemplo, ensayos múltiples pueden contener un número de conjuntos de cebadores diferentes, permitiendo cada conjunto la
20 amplificación de una secuencia génica única a partir de un VIH diferente y pueden estar presentes un número de balizas moleculares correspondientes, que contiene cada uno una sonda específica de secuencia para uno de los amplicones y cada uno marcado con un fluoróforo de diferente color. El color de la fluorescencia resultante, si existe alguno, identifica el VIH en la muestra y el número de ciclos de amplificación requeridos para generar una fluorescencia detectable proporciona una medida cuantitativa del número de organismos diana presentes. Si hay
25 presente en la muestra más de un tipo de VIH, los colores fluorescentes que se producen identifican cuál está presente.

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

35 En una realización, un par de cebadores comprende un cebador directo que tiene una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:14 y un cebador inverso que tiene una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:15.

En otra realización, un par de cebadores comprende un cebador directo que tiene una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:16 y un cebador inverso que tiene una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:17.

40 Un par de cebadores puede comprender un cebador directo que tiene una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:18 y un cebador inverso que tiene una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:19.

45 En una realización, el ácido nucleico diana, como mínimo, es un segmento de un ADNc preparado a partir de transcribir de forma inversa el ARN de un VIH (por ejemplo, VIH-1 del grupo M, VIH-1 del grupo O, VIH-2). Un experto en la materia reconocerá que el ARN puede transcribirse de forma inversa utilizando procedimientos conocidos en la técnica para proporcionar una plantilla para la amplificación mediante cebadores.

50 En otra realización, el ácido nucleico diana, como mínimo, es un segmento de un ADN proviral de VIH (por ejemplo, VIH-1 del grupo M, VIH-1 del grupo O, VIH-2) integrado en el ADN de una célula hospedadora (por ejemplo, linfocito T, macrófago, célula dendrítica). La preparación de ADN celular que comprende ADN proviral es conocida en la técnica.

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

60 La composición puede comprender un par de cebadores que tienen la secuencia tal como se indica en (SEQ ID NO:14 / SEQ ID NO:15); (SEQ ID NO:16 / SEQ ID NO:17); o (SEQ ID NO:18 / SEQ ID NO:19). La composición puede comprender dos de los pares de cebadores. La composición puede comprender los tres pares de oligonucleótidos.

65 La composición puede comprender una sonda de ácido nucleico que tiene la secuencia tal como se indica en (SEQ ID NO:6), (SEQ ID NO:10) o (SEQ ID NO:11), en la que la composición puede comprender además un par de cebadores que tienen la secuencia tal como se indica en (SEQ ID NO:14 / SEQ ID NO:15) o (SEQ ID NO:16 / SEQ ID NO:17).

Se da a conocer una composición que comprende un primer, un segundo y un tercer par de cebadores, en la que el primer par de cebadores tiene la secuencia tal como se indica en (SEQ ID NO:14 / SEQ ID NO:15), en la que el segundo par de cebadores tiene la secuencia tal como se indica en (SEQ ID NO:16 / SEQ ID NO:17), en la que el tercer par de cebadores tiene la secuencia tal como se indica en (SEQ ID NO:18 / SEQ ID NO:19). La composición puede comprender además una primera, una segunda y una tercera sonda, en la que la primera, la segunda y la tercera sonda comprenden respectivamente la secuencia tal como se indica en (SEQ ID NO:6), (SEQ ID NO:10) y (SEQ ID NO:11), en la que la primera, la segunda y la tercera sonda comprenden cada una una marca detectable adecuada para utilizar en una PCR a tiempo real múltiple. La composición puede comprender además una cuarta sonda que tiene la secuencia tal como se indica en (SEQ ID NO:20).

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

La presente invención da a conocer un procedimiento de amplificación de una secuencia diana que corresponde a un VIH. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la secuencia diana puede ser un ADN celular que comprende un ADN proviral de VIH o la secuencia diana puede ser un ADNc preparado a partir de ARN del VIH. Por ejemplo, llevar a cabo una PCR con la secuencia diana y, como mínimo, un cebador directo y un cebador inverso, cada uno siendo capaz de hibridarse con la secuencia diana bajo condiciones de PCR adecuadas que puedan proporcionar la amplificación de la secuencia diana.

La presente invención también da a conocer un procedimiento de amplificación de una secuencia diana, comprendiendo el procedimiento: llevar a cabo una PCR con la secuencia diana como plantilla, en el que la realización comprende proporcionar la PCR con un cebador directo que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:14 y un cebador inverso que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:15. En una realización, la secuencia diana se corresponde con un ADNc preparado a partir de ARN de una muestra que comprende un VIH. En otra realización, la secuencia diana se corresponde con un ADN proviral de un VIH. En algunas realizaciones, el VIH es VIH-1 del grupo M.

La presente invención también da a conocer un procedimiento de amplificación de una secuencia diana, comprendiendo el procedimiento: llevar a cabo una PCR con la secuencia diana como plantilla, en el que la realización comprende proporcionar la PCR con un cebador directo que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:16 y un cebador inverso que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:17. En una realización, la secuencia diana se corresponde con un ADNc preparado a partir de ARN de una muestra que comprende un VIH. En otra realización, la secuencia diana se corresponde con un ADN proviral de un VIH. En algunas realizaciones, el VIH es VIH-1 del grupo O.

La presente invención da a conocer un procedimiento de amplificación de una secuencia diana, comprendiendo el procedimiento: llevar a cabo una PCR con la secuencia diana como plantilla, en el que la realización comprende proporcionar la PCR con un cebador directo que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:18 y un cebador inverso que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:19. En una realización, la secuencia diana se corresponde con un ADNc preparado a partir de ARN de una muestra que comprende un VIH. En otra realización, la secuencia diana se corresponde con un ADN proviral de un VIH. En algunas realizaciones, el VIH es VIH-2.

La presente invención da a conocer un procedimiento de amplificación de una secuencia diana, comprendiendo el procedimiento: llevar a cabo una PCR con la secuencia diana como plantilla, en el que la realización comprende proporcionar la PCR con un primer cebador directo que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:14, un primer cebador inverso que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:15, un segundo cebador directo que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:16 y un segundo cebador inverso que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:17. En una realización, la secuencia diana se corresponde con un ADNc preparado a partir de ARN de una muestra que comprende un VIH. En otra realización, la secuencia diana se corresponde con un ADN proviral de un VIH. En algunas realizaciones, el VIH es VIH-1 del grupo M y/o VIH-1 del grupo O.

La presente invención también da a conocer un procedimiento de amplificación de una secuencia diana, comprendiendo el procedimiento: llevar a cabo una PCR con la secuencia diana como plantilla, en el que la realización comprende proporcionar la PCR con un primer cebador directo que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:14, un primer cebador inverso que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:15, un segundo cebador directo que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:18 y un segundo cebador inverso que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:19. En una realización, la secuencia diana se corresponde con un ADNc preparado a partir de ARN de una muestra que comprende un VIH. En otra realización, la secuencia diana se corresponde con un ADN proviral de un VIH. En algunas realizaciones, el VIH es VIH-1 del grupo M y/o VIH-2.

La presente invención da a conocer un procedimiento de amplificación de una secuencia diana, comprendiendo el procedimiento: llevar a cabo una PCR con la secuencia diana como plantilla, en el que la realización comprende proporcionar la PCR con un primer cebador directo que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:16, un primer cebador inverso que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:17, un segundo cebador directo que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:18 y un segundo cebador inverso que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:19. En una realización, la secuencia diana se corresponde con un ADNc preparado a partir de ARN de una muestra que comprende un VIH. En otra realización, la secuencia diana se corresponde con un ADN proviral de un VIH. En algunas realizaciones, el VIH es VIH-1 del grupo O y/o VIH-2.

La presente invención también da a conocer un procedimiento de amplificación de una secuencia diana, comprendiendo el procedimiento: llevar a cabo una PCR con la secuencia diana como plantilla, en el que la realización comprende proporcionar la PCR con un primer cebador directo que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:14, un primer cebador inverso que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:15, un segundo cebador directo que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:16, y un segundo cebador inverso que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:17, un tercer cebador directo que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:18 y un segundo cebador inverso que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:19. En una realización, la secuencia diana se corresponde con un ADNc preparado a partir de ARN de una muestra que comprende un VIH. En otra realización, la secuencia diana se corresponde con un ADN proviral de un VIH. En algunas realizaciones, el VIH es VIH-1 del grupo M, VIH-1 del grupo O y/o VIH-2.

En otros aspectos, la presente invención da a conocer un procedimiento para determinar VIH en una muestra. Por ejemplo, la muestra puede comprender ARN de VIH y/o ADN proviral o se puede sospechar que la muestra comprende los mismos.

En una realización, la presente invención da a conocer un procedimiento para determinar VIH en una muestra, comprendiendo el procedimiento:

- a. llevar a cabo una PCR con una plantilla de ácido nucleico en la muestra utilizando un cebador directo que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:14 y un cebador inverso que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:15; y
- b. detectar un amplicón generado por los cebadores directo e inverso, con un primer oligonucleótido que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:10 y un segundo oligonucleótido que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:1, en el que la detección del amplicón es indicativa de la presencia del VIH en la muestra.

En una realización, la plantilla es un ADNc preparado a partir de ARN de una muestra que comprende un VIH. En otra realización, la plantilla comprende ADN proviral de un VIH.

En algunas realizaciones, el VIH es un VIH-1 del grupo M. En una realización, el VIH-1 del grupo M tiene una secuencia de ácido nucleico tal como se da a conocer, por ejemplo, en los números de acceso a GENBANK AF033819, AY173953 o AY214024.

El cebador directo puede comprender la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:16 y el cebador inverso puede comprender la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:17. El VIH puede ser un VIH-1 del grupo O. El VIH del grupo O puede tener una secuencia de ácido nucleico tal como se da a conocer, por ejemplo, en los números de acceso a GENBANK AY169802, AB485669.1 o GQ351296.2.

El cebador directo puede comprender la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:18 y el cebador inverso puede comprender la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:19. El VIH puede ser un VIH-2. El VIH-2 puede tener una secuencia de ácido nucleico tal como se da a conocer, por ejemplo, en los números de acceso a GENBANK X52223, AJ011222.1.

La etapa de detección se puede llevar a cabo mediante una serie de técnicas conocidas por el experto en la materia. En una realización, el amplicón se puede detectar utilizando una sonda que está marcada para la

detección y puede ser hibridizada directa o indirectamente con el amplicón. La sonda puede ser soluble o estar unida a un soporte sólido.

5 La sonda puede comprender una marca detectable que se corresponde con un par donador/aceptador adecuado para la detección utilizando FRET, en la que la sonda comprende una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:20 o complementos de las mismas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el par donador/aceptador puede ser FAM/BHQ-1, Quasar[®]/BHQ-2, o cualquier combinación de los mismos.

10 En otra realización, se pueden marcar uno o más de los cebadores utilizados para amplificar el ácido nucleico diana, por ejemplo, con una fracción de unión específica. El producto de extensión del cebador resultante en el que se ha incorporado el cebador marcado se puede capturar con una sonda. La detección de la diana amplificada hibridizada a la sonda se puede lograr mediante la detección de la presencia de la sonda marcada o la diana amplificada marcada utilizando un equipo de detección adecuado y procedimientos que son muy conocidos en la técnica.

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

20 Otras técnicas de detección son conocidas por un experto en la materia entre las que se incluyen, sin constituir limitación, procedimientos que involucran transferencia "southern", técnicas de "dot blot" o detección por captura no isotópica con una sonda marcada.

25 La presente invención da a conocer un procedimiento para determinar VIH-1 del grupo M, VIH-1 del grupo O y/o VIH-2 en una muestra, comprendiendo el procedimiento:

30 a. llevar a cabo una PCR única con la muestra utilizando (i) un primer cebador directo que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:14 y un primer cebador inverso que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:15; (ii) un segundo cebador directo que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:16 y un segundo cebador inverso que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:17; y (iii) un tercer cebador directo que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:18 y un tercer cebador inverso que comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:19; y
 35 b. detectar un amplicón generado por (i) el primer cebador directo y el primer cebador inverso, (ii) el segundo cebador directo y el segundo cebador inverso, y/o (iii) el tercer cebador directo y el tercer cebador inverso, en el que la presencia del amplicón determina el VIH en la muestra.

40 La etapa de detección puede comprender incluir en la PCR una sonda de oligonucleótidos que comprende una marca detectable que se corresponde con un par donador/aceptador adecuado para la detección utilizando FRET, en el que la sonda comprende una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, o complementos de las mismas. Por ejemplo, el par donador/aceptador puede ser FAM/BHQ-1, Quasar[®]/BHQ-2, o cualquier combinación de los mismos.

45 La etapa de detección puede comprender incluir en la PCR una primera sonda que comprende una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:6, una segunda sonda que comprende una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:10 y una tercera sonda que comprende una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:11. La primera, la segunda y la tercera sondas pueden comprender cada una el mismo par donador/aceptador como marca. Por ejemplo, el par donador/aceptador puede ser, sin constituir limitación, FAM/BHQ-1. La primera, la segunda y la tercera sondas pueden comprender cada una pares donador/aceptador diferentes como marca. Por ejemplo, el par donador/aceptador de la primera sonda puede ser Quasar[®]/BHQ-2, en la que la segunda y la tercera sonda comprende cada una FAM/BHQ-1.

55 Por lo tanto, las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención se pueden utilizar solas o en combinación en diferentes procedimientos de amplificación y/o determinación de VIH. Por consiguiente, en algunas realizaciones, las composiciones, procedimientos y kits de la presente invención proporcionan ensayos de PCR en tiempo real múltiples que comprenden uno, dos o tres conjuntos de los cebadores y sondas que se describen en el presente documento, cada uno específico para un VIH diana, en la misma mezcla madre de PCR. Por ejemplo, un ensayo de PCR en tiempo real múltiple según la presente invención puede detectar 3 genotipos de VIH (es decir, VIH-1 del grupo M, VIH-1 del grupo O, VIH-2) utilizando un único ensayo. En este sentido, los cebadores y sondas son capaces de interactuar solamente con su diana específica y no con otros cebadores y sondas presentes en la mezcla madre (por ejemplo, no forman dímeros de cebadores), proporcionando así una amplificación de la diana y una detección en PCR eficientes, por ejemplo, PCR múltiple.

65 En otros aspectos, la presente invención da a conocer un kit que comprende las moléculas de ácido nucleico aisladas incluyendo los cebadores y sondas de la presente invención. El kit se puede desarrollar utilizando las

secuencias de ácidos nucleicos que se dan a conocer en el presente documento. Estas secuencias se pueden utilizar como cebadores en reacciones de amplificación de ácidos nucleicos y/o como sondas en un procedimiento de hibridización de ácidos nucleicos. Los kits son útiles para determinar la presencia de un VIH, en particular secuencias de ácidos nucleicos de VIH-1 del grupo M, VIH-1 del grupo O y/o VIH-2 en una muestra. Los componentes en el kit se pueden obtener comercialmente o se pueden preparar según procedimientos conocidos en la técnica. Además, los componentes del kit pueden estar en solución o liofilizados de forma adecuada. En una realización, los componentes están en el mismo compartimiento y, en otra realización, los componentes están en compartimientos separados. En algunas realizaciones, el kit comprende además instrucciones de uso.

En una realización, el kit comprende un cebador directo, un cebador inverso y una sonda, en el que el cebador directo comprende una secuencia de ácido nucleico del cebador directo tal como se indica en (SEQ ID NO: 14), (SEQ ID NO: 16) o (SEQ ID NO:18), en el que el cebador inverso comprende una secuencia de ácido nucleico del cebador inverso tal como se indica en (SEQ ID NO: 15), (SEQ ID NO: 17) o (SEQ ID NO:19), en el que la sonda comprende una secuencia de ácido nucleico de la sonda tal como se indica en (SEQ ID NO:6), (SEQ ID NO: 10), (SEQ ID NO:11) o (SEQ ID NO:20).

En otra realización, el kit comprende un primer par de cebadores para utilizar en combinación con una primera y segunda sondas para determinar VIH-1 del grupo M, un segundo par de cebadores para utilizar en combinación con una tercera sonda para determinar VIH-1 del grupo O y un tercer par de cebadores para utilizar en combinación con una cuarta sonda para determinar VIH-2, en la que el primer par de cebadores comprende la secuencia tal como se indica en (SEQ ID NO:14 / SEQ ID NO:15), en el que la primera y segunda sondas comprenden respectivamente la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11, en el que el segundo par de cebadores comprende la secuencia tal como se indica en (SEQ ID NO:16 / SEQ ID NO:17), en el que la tercera sonda comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:6, en el que el tercer par de cebadores comprende la secuencia tal como se indica en (SEQ ID NO:18 / SEQ ID NO:19), en el que la cuarta sonda comprende la secuencia tal como se indica en SEQ ID NO:20.

Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente a modo ilustrativo.

30 EJEMPLOS

Ejemplo 1

Determinación de VIH mediante PCR Múltiple

Para determinar la presencia de ARN de VIH en una muestra de plasma, se llevó a cabo un ensayo de PCR simultáneo utilizando cebadores y sondas de manera que se proporcionaron los cebadores para la amplificación de una plantilla de ADNc preparada a partir de ARN de VIH-1 del grupo M, VIH-1 del grupo O y/o VIH-2, que puede estar presente en la muestra y se detectaron en tiempo real los amplicones resultantes mediante la hibridización de las sondas específicas de amplicón, que fueron marcadas para la detección mediante FRET.

Se seleccionaron tres conjuntos de cebador/sonda para asegurar la amplificación y detección eficientes de ARN de VIH-1 del grupo M, VIH-1 del grupo O y/o VIH-2. Para la detección, cada sonda comprende un donador en el extremo 5' y un aceptador en el extremo 3'.

Para determinar la presencia de VIH-1 del grupo M en la muestra, se emplearon cebadores y sondas de detección que tienen las siguientes secuencias:

50	Cebador Directo 1: 5'- gac atc aag cag cca tgc aaa t -3'	(SEQ ID NO:14);
	Cebador Inverso 2: 5'- agt agt tcc tgc tat gtc act tc -3'	(SEQ ID NO:15);
	Sonda 1: 5'-agg pnn tgn atg pan tgg atg-3'	(SEQ ID NO:10); y
	Sonda 2: 5'-agg pnn tgn ntg ptn tgg atg-3'	(SEQ ID NO:11);

en las que p es 6H, 8H-3, 4-dihidropirimido[4,5-c][1,2]oxazin-7-ona y n es [5-(1-propinil)-2'-deoxiCitidina (pdC).

Para determinar la presencia de VIH-1 del grupo O en la muestra, se emplearon cebadores y sondas de detección que tienen las siguientes secuencias:

60	Cebador Directo 3: 5'- gag gac atc aag ggg ctt tac a -3'	(SEQ ID NO:16);
	Cebador Inverso 4: 5'- cag caa tgt cac ttc ctg ttg -3'	(SEQ ID NO:17); y
	Sonda 3: 5'- tcc ctt atc tgc cct ggt ggt aac gg -3'	(SEQ ID NO:6).

Para determinar la presencia de VIH-2 en la muestra, se emplearon cebadores y sondas de detección que tienen las siguientes secuencias:

65	Cebador Directo 5: 5'- ggc aga ggt agt gcc ag -3'	(SEQ ID NO:18);
----	---	-----------------

Cebador Inverso 6: 5'- ggt cgc cca cac aat taa gc-3'
 Sonda 4: 5'- agg cac tct cag aag gct gca cg-3'

(SEQ ID NO:19); y
 (SEQ ID NO:20).

Se preparó una mezcla madre de PCR (MMX) que comprende lo siguiente: tampón de PCR 1x (Bicina 50 mM, acetato potásico 115 mM, glicerol al 8%, pH 8,2) (se puede utilizar de forma alternativa un tampón base de Tris; dNTPs 300 µM; DMSO al 3%; MgCl₂ 3,5 mM; colorante de referencia ROX 1x (0,5 µM) (el Colorante de Referencia ROX es suministrado a una concentración de 50X. Está compuesto de un conjugado de glicina de 5-carboxi-X-rodamina, succinimidil éster (25 µM) en Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), EDTA 0,1 mM, Tween® 20 al 0,01% (Invitrogen, Carlsbad, CA)) (se puede utilizar de forma alternativa una formulación diferente de referencia ROX denominada "bajo ROX" (Eurogentec, Seraing, Bélgica)); cebador directo de VIH-1 del grupo M 100 nM (cebador directo 1); cebador inverso de VIH-1 del grupo M 300 nM VIH-1 (cebador inverso 2); sonda de VIH-1 del grupo M 100 nM (sonda 1); sonda de VIH-1 del grupo M 100 nM (sonda 2); cebador directo de VIH-1 del grupo O 100 nM (cebador directo 3); cebador inverso de VIH-1 del grupo O 300 nM VIH-1 (cebador inverso 4); sonda de VIH-1 del grupo O 100 nM (sonda 3); cebador directo de VIH-2 (cebador directo 5); cebador inverso de VIH-2 (cebador inverso 6); sonda de VIH-2 100 nM (sonda 4); sonda de Control Interno 100 nM; Transcriptasa Inversa 20 Unidades/reacción (RT); y Taq ADN polimerasa 2,5 Unidades/reacción.

La MMX se combinó con ARN viral aislado de muestras de plasma que contienen el virus utilizando un procedimiento de extracción de virus conocido en la técnica. El ARN de VIH + MMX se sometió a una PCR de una sola etapa, en la que la transcripción inversa, la amplificación del ADNc y la detección se llevaron a cabo en el mismo tubo, utilizando un instrumento de PCR en tiempo real disponible comercialmente (Applied Biosystems 7300 ó 7500). Las condiciones de los ciclos térmicos se muestran en la tabla 1:

Tabla 1: Condiciones de los ciclos de PCR.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Transcripción Inversa (RT)	55°C	60 minutos	1
Activación de Taq	95°C	2 minutos	1
Desnaturalización	90°C	15 segundos	15
Hibridización / Extensión	52°C	1 minuto	
Desnaturalización	90°C	15 segundos	30
Hibridización / Extensión	58°C	1 minuto	

A continuación de la amplificación por PCR, se analizaron las señales generadas utilizando el programa SDS del instrumento. Los resultados muestran curvas de amplificación fuertes con valores de C_T inferiores a 30. Por lo tanto, fue posible detectar los tres genotipos de VIH, VIH-1 del grupo M, VIH-1 del grupo O y VIH-2, a partir de muestras de plasma mezcladas. Las sondas presentes en el ensayo para la detección de VIH-1 del grupo M y VIH-2 se marcaron con el mismo colorante fluorescente en cuyo caso se detectaron los dos genotipos pero sin diferenciarlos. La sonda para la detección de VIH-1 del grupo O se marcó con un colorante fluorescente diferente que permite la diferenciación del VIH del grupo O del grupo M y VIH-2.

La tabla 2 es una alineación de secuencias en base a regiones genómicas de varios subtipos de VIH-1 del grupo M and FRCs.

Tabla 2: Alineación de secuencias que son complementarias a las secuencias de variantes de VIH correspondientes.

FRC01	5'-agg ccc tgc atg tac tgg gtg-3' (SEQ ID NO:1)
FRC02	5'-agg tcc tgc ctg tac tgg atg-3' (SEQ ID NO:2)
Subtipo G	5'-agg ccc tgc ctg ctg tgg atg-3' (SEQ ID NO:3)
Subtipo F1	5'-agg tcc tgc atg cac tgg atg-3' (SEQ ID NO:4)
Subtipo A	5'-agg ccc tgc atg tac tgg atg-3' (SEQ ID NO:5)
Sonda 1	5'-agg pnn tgn atg pan tgg atg-3' (SEQ ID NO:10)
Sonda 2	5'-agg pnn tgn ntg ptn tgg atg-3' (SEQ ID NO:11)

Las Sondas 1 y 2, para la detección de VIH-1 del grupo M, tienen dos inserciones de pirimidina universal (tabla 2, en las posiciones 4 y 13), 6H, 8H-3, 4-dihidropirimido[4,5-c][1,2]oxazin-7-ona, que funcionan como "parches" en los sitios de parche de la secuencia de la sonda de la falta de coincidencia (polimorfismo) entre las variantes del VIH-1 del grupo M. Estos dos sitios de polimorfismo en particular, que se corresponden con el complemento de las posiciones 4 y 13 de la secuencia en la tabla 2, corresponden a sitios de polimorfismo en el genoma de VIH que están determinados por una base purina (A o G). La colocación de una pirimidina universal en la sonda en estos sitios permite la detección de cualquiera de las bases, aumentando así la especificidad del ensayo. Las Sondas 1 y 2 se diseñaron a partir de la misma secuencia genómica, sin embargo, la Sonda 1 tiene una mayor homología con el VIH del grupo M subtipos A, B, C, D, F, y FRC01, mientras que la Sonda 2 tiene una mayor homología con el subtipo G y FRC02. Utilizar ambas sondas en el mismo ensayo puede proporcionar la detección de los 6 subtipos del grupo M, así como de FRC01 y FRC02.

aggtcctgcc tgtactggat g 21
 <210> 3
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana
 10 <400> 3
 aggccctgcc tgctgtggat g 21
 <210> 4
 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana
 <400> 4
 aggtcctgca tgcactggat g 21
 25 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana
 <400> 5
 35 aggccctgca tgtactggat g 21
 <210> 6
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana
 <400> 6
 45 tcccttatct gccctggtgg taacgg 26
 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> nucleótido universal
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> a o c
 65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)

<223> nucleótido universal
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (14)..(14)
 <223> a o t
 <400> 7
 agnncctgcn tgnnctggat g 21
 10 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> nucleótido universal
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> citidina o un análogo de citidina que tiene una modificación en C-5
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> citidina o un análogo de citidina que tiene una modificación en C-5
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> nucleótido universal
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> citidina o un análogo de citidina que tiene una modificación en C-5
 <400> 8
 45 aggnntgna tgnantggat g 21
 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> nucleótido universal
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> análogo de citidina que tiene una modificación en C-5
 65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(10)

- <223> análogo de citidina que tiene una modificación en C-5
- <220>
<221> misc_feature
5 <222> (13)..(13)
<223> nucleótido universal
- <220>
<221> misc_feature
10 <222> (15)..(15)
<223> análogo de citidina que tiene una modificación en C-5
- <400> 9
15 aggnntgna tgnntggat g 21
- <210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
<223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- <220>
25 <221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> nucleótido universal
- <220>
30 <221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> análogo de citidina que tiene una modificación en C-5
- <220>
35 <221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> análogo de citidina que tiene una modificación en C-5
- <220>
40 <221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> nucleótido universal
- <220>
45 <221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> análogo de citidina que tiene una modificación en C-5
- <400> 10
50 aggnntgna tgnantggat g 21
- <210> 11
<211> 21
<212> ADN
55 <213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- 60 <220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> nucleótido universal
- 65 <220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)

- <223> análogo de citidina que tiene una modificación en C-5
- <220>
<221> misc_feature
5 <222> (9)..(10)
<223> análogo de citidina que tiene una modificación en C-5
- <220>
<221> misc_feature
10 <222> (13)..(13)
<213> nucleótido universal
- <220>
<221> misc_feature
15 <222> (15)..(15)
<223> análogo de citidina que tiene una modificación en C-5
- <400> 11
20 aggnntggn tgnttggat g 21
- <220> 12
<221> 21
<222> ADN
<223> Secuencia Artificial
25
- <220>
<223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- <220>
30 <221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> nucleótido universal
- <220>
35 <221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> nucleótido universal
- <400> 12
40 agncctgca tgnactggat g 21
- <210> 13
<211> 21
<212> ADN
45 <213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- <220>
50 <221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> nucleótido universal
- <220>
55 <221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> nucleótido universal
- <400> 13
60 agncctgcc tgntctggat g 21
- <210> 14
<211> 22
65 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

<400> 14
 5 gacatcaagc agccatgcaa at 22

<210> 15
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

<400> 15
 15 agtagttcct gctatgtcac ttc 23

<210> 16
 <211> 22
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

<400> 16
 25 gaggacatca aggggcttta ca 22

<210> 17
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

<400> 17
 35 cagcaatgtc acttctgtt g 21

<210> 18
 <211> 17
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

<400> 18
 45 ggcagaggta gtgccag 17

<210> 19
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

<400> 19
 55 ggtcgcccac acaattaagc 20

<210> 20
 <211> 23
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

<400> 20
aggcactctc agaaggctgc acg 23

5

<210> 21
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

<400> 21
accatcaatg aggaagctgc agaatgggat 30

15

<210> 22
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20

<220>
<223> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

<400> 22
tcccttatct gccctggtgg taacgg 26

25

