

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 465**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

**C12N 15/37** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2011 PCT/US2011/025046**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO11103159**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2011 E 11745156 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2536853**

54 Título: **Ensayo para detectar serotipos estrechamente relacionados del papilomavirus humano (HPV)**

30 Prioridad:

**16.02.2010 US 304941 P**

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

**25.04.2018**

73 Titular/es:

**BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)  
One Becton Drive  
Franklin Lakes, NJ 07417, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, CHI;  
PECK, HUGH J.;  
PORTER, MICHAEL;  
RICHART, GREGORY A. y  
MCMILLIAN, RAY A.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 665 465 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

Ensayo para detectar serotipos estrechamente relacionados del papilomavirus humano (HPV)

**Antecedentes de la invención**

- 5 Se han identificado más de 80 tipos de papilomavirus humano (HPV). Los diferentes tipos de HPV causan una amplia variedad de fenotipos biológicos, desde verrugas proliferativas benignas hasta carcinomas malignos (para una revisión, véase McMurray et al., *Int. J. Exp. Pathol.* 82(1): 15-33 (2001)). HPV6 y HPV11 son los tipos más comúnmente asociados con verrugas benignas, mientras que HPV16 y HPV18 son los tipos de alto riesgo asociados con más frecuencia con lesiones malignas. Por lo tanto, la determinación del tipo específico de HPV en una muestra clínica es crítica para predecir el riesgo de desarrollo de enfermedad asociada con el HPV.
- 10 Se han usado varios métodos basados en ácido nucleico para identificar y cuantificar los tipos específicos de HPV en muestras clínicas, tales como la detección de ácido nucleico vírico por hibridación in situ, análisis de transferencia Southern, captura de híbridos o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ensayo Hybrid Capture® II (Qiagen, Inc., Valencia, CA) usa la captura de anticuerpo y la detección de señal no radiactiva, pero solo detecta una sola diana de un conjunto dado de tipos de HPV (véase, p. ej., Clavel et al., *British J. Cancer* 80(9): 1306-11 (1999)).
- 15 Adicionalmente, debido a que el ensayo de Hybrid Capture® II usa un cóctel de sondas de ARN (los cócteles de sondas están disponibles para tipos de HPV de alto riesgo o de bajo riesgo), no proporciona información sobre el tipo específico de HPV detectado en una muestra, sino que más bien proporciona solo un positivo o negativo para la presencia de HPV de alto riesgo o de bajo riesgo. De forma similar, muchos métodos basados en PCR a menudo implican la amplificación de una sola secuencia diana de HPV específico seguido de transferencia del amplicón resultante a una membrana e hibridación con una sonda de oligonucleótido con marcaje radiactivo.
- 20 Otros métodos explotan la alta homología entre los genes de HPV específicos de diferentes tipos mediante el uso de cebadores de consenso disponibles en el mercado, capaces de amplificación por PCR de numerosos tipos de HPV presentes en una muestra. La presencia de un tipo específico de HPV después se identifica usando una sonda de oligonucleótido específica de tipo. Véase, p. ej., Kleter et al., *Journal of Clinical Microbiology* 37(8): 2508-2517 (1999); Gravitt et al., *Journal of Clinical Microbiology* 38(1): 357-361 (2000). De forma similar, los ensayos que usan cebadores de PCR degenerados se aprovechan de la homología entre tipos de HPV que permiten la detección de un número mayor de tipos de HPV que los métodos que usan conjuntos específicos de cebadores. Véase, p. ej., Harwood et al., *Journal of Clinical Microbiology* 37(11): 3545-3555 (1999). Dichos ensayos también requieren experimentación adicional para identificar tipos de HPV específicos.
- 25 Los métodos de PCR descritos antes se pueden asociar con varios problemas. Por ejemplo, diferencias en las eficacias de las reacciones entre los tipos de HPV pueden producir una amplificación desproporcionada de algunos tipos con respecto a otros. Adicionalmente, el equilibrio para la amplificación se dirigirá hacia aquellos tipos que existen con números de copias mayores en una muestra, lo cual consumirá los componentes de reacción de la PCR, haciendo que sea menos probable la amplificación de los tipos minoritarios de HPV.
- 30 También se describe en la técnica un ensayo basado en PCR de 5'-exonucleasa fluorogénica (PCR de Taq-Man) que permite la detección de productos de la PCR en tiempo real y elimina la necesidad de radiactividad. Véase, p. ej., la patente de EE.UU. nº 5.538.848; Holland et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7276-7280 (1991). Este método usa una sonda marcada que comprende un indicador fluorescente (fluoróforo) y un amortiguador que hibrida con el ADN diana entre los cebadores de la PCR. La excitación del fluoróforo produce la liberación de una señal fluorescente por el fluoróforo que es amortiguada por el amortiguador. Los amplicones se pueden detectar por la actividad de la 5'-3' exonucleasa de la ADN polimerasa TAQ, que degrada del ADN bicatenario encontrado durante la extensión del cebador de la PCR, liberando así el fluoróforo de la sonda. Después, la señal fluorescente ya no es amortiguada y la acumulación de señal fluorescente, que está directamente correlacionada con la cantidad de ADN diana, se puede detectar en tiempo real con un fluorómetro automático.
- 35 Los ensayos de PCR de Taq-Man se han adaptado para la detección de tipos de HPV. Swan et al. (*Journal of Clinical Microbiology* 35(4): 886-891 (1997)) describen un ensayo de sonda fluorogénica que usa cebadores de HPV específicos de tipo para amplificar una parte del gen L1 junto con sondas de tipo específico. El ensayo de Swan et al. mide la señal fluorescente al final de un número fijo de ciclos de PCR (lectura de punto final) y no en tiempo real.
- 40 Josefsson et al. (*Journal of Clinical Microbiology* 37(3): 490-96 (1999)) describe un ensayo de Taq-Man que se dirige a una parte altamente conservada del gen E1 junto con sondas específicas de tipo marcadas con diferentes colorantes fluorescentes. Se amplificaron una serie de tipos de HPV usando una mezcla de cebadores específicos y degenerados. Josefsson et al. usaba hasta tres sondas específicas de tipo por ensayo, que se diseñaron para detectar una parte del gen E1 de diferentes tipos de HPV. A diferencia del ensayo de Swan et al., Josefsson et al. medían la acumulación de fluorescencia en tiempo real.
- 45 Moberg et al. (*Journal of Clinical Microbiology* 41(7):3221-3228 (2003)) describen un sistema basado en PCR en tiempo real para la cuantificación simultánea de los tipos de papilomavirus humano asociados con alto riesgo de cáncer de cuello uterino.

Tucker et al. (*Molecular Diagnosis* 6(1): 39-47 (2001)) describen un ensayo que se dirige a una región conservada que abarca la unión E6/E7. Como el ensayo de Josefsson, Tucker et al. usaban detección en tiempo real y sondas fluorescentes específicas de tipo. Tucker et al. también usaban PCR múltiplex para detectar simultáneamente secuencias dirigidas a HPV y los locus celulares de actina o globina en el mismo tubo de reacción.

5 Uno de los desafíos particulares con la detección del HPV es el hecho de que hay muchos tipos de HPV de interés clínico. Aunque se conocen los ensayos múltiplex para la detección del HPV, los ensayos múltiplex están limitados por una serie de canales colorimétricos para detección. Estos canales son de diferentes longitudes de onda de luz (o intervalos o bandas de longitudes de onda). Cada canal detecta una señal emitida por un resto señal que emite luz a una longitud de onda de canal específico. El número de tipos de HPV que se detecta está, por lo tanto, limitado por el número de restos señal diferentes detectables claramente.

A pesar del desarrollo de los ensayos de HPV descritos antes, sería ventajoso desarrollar un ensayo múltiplex que sea altamente sensible y reproducible y que requiera menos horas de trabajo comparado con los métodos descritos en la técnica. Dados los muchos tipos de HPV, sería útil detectar más tipos de HPV que canales de detección hay en el ensayo.

### 15 **Compendio de la invención**

La presente invención se dirige a una amplificación por PCR en tiempo real que desarrolla la química de Taq-Man para detectar simultáneamente más tipos de HPV que canales hay para la detección. En otras palabras, en un ensayo con N canales, el número de tipos de HPV que se detectan es al menos N+1.

20 El ensayo desarrolla un conjunto de cebadores/sondas para la detección de cada tipo de HPV para el que el ensayo está configurado para detectar. Entre los diferentes serotipos susceptibles para la detección por el ensayo se incluyen, por ejemplo, los tipos de HPV 33, 39, 51, 56, 58, 59, 66 y 68. El experto apreciará que los conjuntos de cebadores/sondas descritos en la presente memoria se pueden combinar con otros conjuntos de cebadores/sondas para otros tipos de HPV (p. ej., 16, 18 y 45). Al menos un tipo se detecta usando un solo conjunto de cebadores/sondas. En el contexto de la amplificación por PCR usando un ensayo Taq-Man, el conjunto de cebadores y sondas es al menos un cebador directo, un cebador inverso y una sonda. Se seleccionan al menos dos tipos por una pareja de conjuntos de cebadores y sondas con secuencias de oligonucleótidos que son degeneradas unas con respecto a otras. "Secuencias degeneradas" como se usa en la presente memoria, son dos cebadores o sondas de oligonucleótidos que son complementarios del mismo locus del mismo gen de tipos diferentes estrechamente relacionados y que tienen variaciones de secuencia menores unas respecto a otras, para hacerlas discriminatorias entre los dos tipos.

30 En una realización de la presente invención, los conjuntos de cebadores y sondas degenerados son para la detección de los tipos de HPV 39 y 68. El conjunto de cebadores/sondas se dirige al mismo locus en el gen E6 de ambos tipos. La longitud de la diana es 91 nucleótidos y se ilustra en la figura 1. La diana es solo un segmento del gen E6 entero. La diana para el conjunto de cebadores/sondas degenerado para los HPV de tipos 39 y 68 es el SEQ ID NO: 36. En una realización preferida, los restos señal para ambas sondas son un marcador de colorante de cianina disponible en el mercado como CY5.

40 En esta realización, el conjunto de cebadores y sondas que no está degenerado discrimina el HPV de tipo 51. El conjunto de cebadores/sondas para el tipo 51 también se dirige al gen E6, aunque en un locus diferente. En una realización preferida, los restos señal para esta sonda en este conjunto de cebadores y sondas son FAM, que se identifica específicamente más adelante.

45 En una segunda realización de la presente invención, los conjuntos de cebadores/sondas degenerados son para la detección de los HPV de tipos 33 y 58. El conjunto de cebadores/sondas se dirige al mismo locus en el gen E6 de ambos tipos. La longitud de la diana es 138 nucleótidos y se ilustra en la figura 2. La diana es solo un segmento del gen E6 entero. La diana para el conjunto de cebadores/sondas degenerado para los HPV de tipos 33 y 58 es el SEQ ID NO: 37. En una realización preferida, los restos señal para ambas sondas son FAM.

En esta realización, el conjunto de cebadores y sondas que no está degenerado discrimina el HPV de tipo 59. El conjunto de cebadores/sondas para el tipo 59 también se dirige al gen E6, pero no necesariamente al mismo locus. En una realización preferida, los restos señal para esta sonda en este conjunto de cebadores y sondas son CY5, que se identifica específicamente más adelante.

50 En una tercera realización de la presente invención, los conjuntos de cebadores/sondas degenerados son para la detección de los HPV de tipos 56 y 66. El conjunto de cebadores/sondas se dirige al mismo locus en el gen E6 en ambos tipos. La longitud de la diana es de 79 nucleótidos y se ilustra en la figura 3. La diana es solo un segmento del gen E6 entero. La diana para el conjunto de cebadores/sondas degenerado para los HPV de tipos 56 y 66 es el SEQ ID NO: 38. En una realización preferida, los restos señal para ambas sondas son CY5.

55 En esta realización, el conjunto de cebadores y sondas no está degenerado y discrimina el tipo 59 de HPV. El conjunto de cebadores/sondas para el tipo 59 se dirige al gen E6. En una realización preferida, los restos señal para esta sonda en este conjunto de cebadores y sondas son CY5, que se identifica específicamente más adelante. En

esta realización, se usa el mismo resto señal para el HPV tipo 59 que el usado también para el HPV de tipos 56\_66. Puesto que están los mismos colorantes en el mismo canal, no hay discriminación óptica entre los tipos de HPV 59 y 56\_66 en esta realización.

- 5 Esta realización contempla un ensayo múltiple que implementa un conjunto más de cebadores/sondas (sea degenerado o discriminatorio) para otro serotipo más de HPV (p. ej., el conjunto de cebador/sonda degenerado para los serotipos de HPV 33 y 58). El resto señal para este tipo de serotipo de HPV no es CY5, y emite a una longitud de onda que se puede detectar diferente de la longitud de onda de emisión de CY5 (p. ej., FAM).

En otras realizaciones, el resto señal para el tipo 59 de HPV es FAM, que se puede distinguir ópticamente del resto señal CY5 para el conjunto de cebador/sonda degenerado para los serotipos 56 y 66 de HPV.

- 10 Realizaciones alternativas contemplan un ensayo o un conjunto de sondas o un kit con todas y cada una de las combinaciones de conjuntos de cebadores/sondas y conjuntos de cebadores/sondas degenerados descritos en la presente memoria. Específicamente, cualquiera de los conjuntos de cebadores/sondas para los HPV de serotipos HPV 51 o HPV 59, se puede combinar con cualquiera de los conjuntos de cebadores/sondas degenerados para los HPV de serotipos 39\_68; HPV 33\_58; y HPV 56\_66. Está específicamente contemplado un ensayo o conjunto de sondas o un kit que combina el conjunto de cebador/sonda para HPV 51 con el conjunto de cebadores y sondas degenerados de uno o más de HPV 39\_68; HPV 33\_58; y HPV 56\_66. Un ensayo o conjunto de sondas o un kit que combina el conjunto de cebadores/sondas para HPV 59 con el conjunto de cebadores y sondas degenerado de uno o más de HPV 39\_68; HPV 33\_58; y HPV 56\_66. Están contempladas realizaciones donde los restos señales para las sondas son los mismos o diferentes colorantes. Puesto que está contemplado un ensayo múltiple, los conjuntos de cebadores/sondas se pueden combinar con otros conjuntos de cebadores/sondas configurados para detectar la presencia o ausencia de otros serotipos de HPV. En aquellas realizaciones donde el resto señal para la sonda detectora en los conjuntos de cebadores/sondas es el mismo que el resto señal para el conjunto de cebadores/sondas para los serotipos de HPV 51 o 59, está contemplado que el ensayo múltiple incluya un cuarto conjunto de cebadores/sondas para un cuarto serotipo de HPV (p. ej., HPV 31, HPV 52, HPV 45, etc.) y que el cuarto conjunto de cebadores/sondas tenga un resto señal que es diferente de los restos señales para las sondas detectoras de los conjuntos de cebadores/sondas degenerados y los conjuntos de cebadores/sondas de HPV 51 o 59. También está contemplado en la presente memoria ensayos múltiple en los que se combinan dos conjuntos de cebadores/sondas degenerados en un ensayo. Por ejemplo, en un micropocillo se puede combinar un primer conjunto de cebadores/sondas degenerado para detectar la presencia de los serotipos de HPV 33 y 58 con un segundo conjunto de cebadores/sondas degenerado para detectar la presencia o ausencia de los serotipos de HPV 56 y 66. En estas realizaciones, las sondas del primer conjunto de cebadores/sondas degenerado tienen un resto señal que emite a una longitud de onda que se puede detectar diferente de la longitud de onda de emisión del resto señal para el segundo conjunto de cebadores/sondas degenerado. En este ejemplo, el resto señal para los serotipos de HPV 33 y 58 sería FAM y el resto señal para los serotipos de HPV 56 y 66 sería CY5.

- 35 Además de los restos de señalización descritos antes, las sondas también tienen un amortiguador oscuro no fluorescente. Un ejemplo de un amortiguador oscuro adecuado es BHQ™ 1 (Biosearch Technologies), que es adecuado para usar con el fluoróforo FAM. Otro ejemplo de un amortiguador adecuado es BHQ™ 2 (Biosearch Technologies), que es adecuado para usar con el fluoróforo CY5. Otros ejemplos de restos de señalización son bien conocidos para los expertos en la técnica y no se describen con detalle en la presente memoria.

- 40 Como se usa en la presente memoria, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de actuar como un punto de inicio de síntesis junto con una cadena complementaria cuando se ponen en condiciones en las que es catalizada la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario de una cadena de ácido nucleico. Dichas condiciones incluyen la presencia de cuatro trifosfatos de desoxirribonucleósidos diferentes y un agente de inducción de la polimerización tal como ADN polimerasa o transcriptasa inversa, en un tampón adecuado ("tampón" incluye componentes que son cofactores, o que afectan a la fuerza iónica, pH, etc.) y a una temperatura adecuada. Como se usa en la presente memoria, un cebador de oligonucleótido se puede encontrar de forma natural, como en una digestión de restricción purificada, o se puede producir de forma sintética. El cebador preferiblemente es monocatenario para la máxima eficacia en la amplificación.

- 50 Como se usa en la presente memoria, "pareja de cebadores" se refiere a dos cebadores, un cebador directo y un cebador inverso, que son capaces de participar en la amplificación por PCR de un segmento de ácido nucleico en presencia de una ácido nucleico polimerasa para producir un amplicón de PCR. Los cebadores que comprenden una pareja de cebadores pueden ser específicos para el mismo gen de HPV, dando como resultado un amplicón que consisten en una secuencia de nucleótidos derivada de un solo gen de HPV. Alternativamente, los cebadores que comprenden una pareja de cebadores pueden ser específicos para diferentes genes de HPV que residen próximos unos a otros dentro del genoma del HPV, produciendo así amplicones que consisten en una secuencia de nucleótidos derivados de más de un gen.

- 60 Como se usa en la presente memoria, "diferentes espectros de generación de imágenes" en referencia a los fluoróforos de la presente invención, significa que cada fluoróforo emite energía a un máximo de emisión diferente respecto a todos los otros fluoróforos usados en el ensayo particular. El uso de fluoróforos con máximo de emisión único permite la detección simultánea de la energía fluorescente emitida por cada uno de la pluralidad de fluoróforos

usados en el ensayo particular.

5 Como se usa en la presente memoria, el término "discriminatorio", usando en referencia a los cebadores y sondas de oligonucleótidos de la presente invención, significa que dichos cebadores y sondas son específicos para un solo tipo de HPV. Incluye cebadores y sondas de HPV específicos para un solo tipo de HPV, pero también comparte alguna homología con otros tipos de HPV. Cebadores y sondas "discriminatorios" de la presente invención incluyen los oligonucleótidos que carecen de homología 3' con otros tipos de HPV en al menos un nucleótido o más. Dicho resto que es único para el tipo de HPV específico en la posición específica y actúa para discriminar el tipo de HPV de los otros en el alineamiento, se denomina una "base discriminadora". El término "discriminatorio" en referencia a 10 los oligonucleótidos no incluye cebadores y sondas que son específicos para más de un tipo de HPV, es decir, aquellos que comparten homología completa con más de un tipo de HPV. En relación con esto, los conjuntos de cebadores/sondas degenerados descritos en la presente memoria no discriminan para el tipo de HPV para el que están configurados. Por ejemplo, para el conjunto de cebadores/sondas degenerado que se dirige a los tipos de HPV 39 y 68, el conjunto de cebadores/sondas para el tipo de HPV 39 tiene una preferencia por el tipo de HPV 39 frente al tipo de HPV 68, pero no discrimina el tipo de HPV 39 frente al tipo de HPV 68. Debido a que los conjuntos de cebadores/sondas degenerados no discriminan entre tipos de HPV, las sondas preferiblemente tienen el mismo resto señal. Puesto que el ensayo está configurado para determinar la presencia o ausencia de estos tipos de HPV en el agregado, no es necesario usar dos canales ópticos para este fin. Además, cuando el conjunto de cebadores/sondas degenerado se combina con otros conjuntos de cebadores/sondas en un solo micropocillo para un ensayo múltiplex, los resto señal para los otros conjuntos de cebadores/sondas (sean discriminatorios o no discriminatorios) pueden ser iguales o diferentes. Los restos señal para el ensayo son en gran medida una elección de diseño. El experto en la técnica usará los mismos restos señal para los conjuntos de cebadores/sondas en el mismo micropocillo, cuando sea necesario saber si está presente el tipo particular de HPV. Se puede usar el mismo resto señal en conjuntos de cebadores/sondas para diferentes serotipos de HPV cuando es suficiente saber si está presente solo uno de esos tipos.

25 Como se usa en la presente memoria, "amplicón" se refiere a un producto específico de una reacción de PCR, que se produce por amplificación por PCR de una muestra que comprende ácido nucleico en presencia de una ácido nucleico polimerasa y una pareja de cebadores específica. Un amplicón puede consistir en una secuencia de nucleótidos derivada de un solo gen de un solo tipo de HPV o un amplicón puede consistir en una secuencia de nucleótidos derivada de más de un gen de un solo tipo de HPV.

30 Como se usa en la presente memoria, "conjunto de cebador/sonda" se refiere a un grupo de una pareja de cebadores de oligonucleótidos y una sonda de oligonucleótidos que hibrida con una secuencia de nucleótidos específica de un solo tipo de HPV. Dicho conjunto de oligonucleótidos consiste en: (a) un cebador directo discriminatorio que hibrida con un primer sitio de una secuencia de ácido nucleico de un tipo de HPV; (b) un cebador inverso discriminatorio que hibrida con un segundo sitio de la secuencia de ácido nucleico del tipo de HPV en la dirección 3' del primer sitio, y (c) una sonda fluorescente marcada con un fluoróforo y un amortiguador, que hibrida con un sitio de la secuencia de ácido nucleico del tipo de HPV entre los cebadores. En otras palabras, un conjunto de oligonucleótidos consiste en un conjunto de cebadores de PCR específicos capaz de iniciar la síntesis de un amplicón específico para un solo tipo de HPV y una sonda fluorescente que hibrida con el amplicón.

Como se usa en la presente memoria, "pluralidad" significa dos o más.

40 Como se usa en la presente memoria, "hibrida específicamente" en relación con conjuntos de oligonucleótidos, cebadores de oligonucleótidos o sondas de oligonucleótidos, significa que dichos conjuntos, cebadores o sondas de oligonucleótidos hibridan con una secuencia de ácido nucleico de un solo tipo de HPV.

45 Como se usa en la presente memoria, "gen" significa un segmento de ácido nucleico implicado en la producción de una cadena de polipéptido. Incluye tanto secuencias traducidas (región codificante) como secuencias no traducidas 5' y 3' (regiones no codificantes) así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones). Para fines de descripción de las realizaciones de la presente invención, el genoma del HPV tiene una pluralidad de genes, p. ej., L1, L2, y E1, E2, E4-E7.

50 Como se usa en la presente memoria, "locus" se refiere a la posición en un cromosoma en el que la que reside el gen para un rasgo. El término locus incluye cualquiera de los alelos de un gen específico. También incluye genes homólogos de diferentes tipos de HPV. Por ejemplo, ensayos de PCR que detectan el gen L1 en HPV16 y HPV6 son ensayos de un solo locus, a pesar de la detección de secuencias de diferentes tipos de HPV. Al contrario, por ejemplo, ensayos que detectan el gen L1 y el gen E1 de un solo tipo de HPV son ensayos de locus múltiple, incluso aunque se detecte un solo tipo de HPV.

55 Como se usa en la presente memoria, "HPV" significa papilomavirus humano. "HPV" es un término general usado para referirse a cualquier tipo de HPV sea actualmente conocido o descrito posteriormente.

Como se usa en la presente memoria, "fluoróforo" se refiere a una molécula indicadora fluorescente que, tras excitación con un láser, lámpara de tungsteno, mercurio o xenón, o un diodo de emisión de luz, libera energía en forma de luz con un espectro definido. Mediante el proceso de transferencia de energía por resonancia de

fluorescencia (FRET), la luz emitida del fluoróforo puede excitar una segunda molécula cuyo espectro de excitación solapa con el espectro de emisión del fluoróforo. La transferencia de energía de emisión del fluoróforo a otra molécula amortigua la emisión del fluoróforo. La segunda molécula se conoce como una molécula amortiguadora. El término "fluoróforo" se usa de forma intercambiable en la presente memoria con el término "indicador fluorescente".

5 Como se usa en la presente memoria, "amortiguador" o "molécula amortiguadora" se refiere a una molécula que, cuando está unida a una sonda fluorescente que comprende un fluoróforo, es capaz de aceptar la energía emitida por el fluoróforo, amortiguando así la emisión del fluoróforo. Un amortiguador puede ser fluorescente, que libera la energía aceptada en forma de luz, o no fluorescente, que libera la energía aceptada en forma de calor, y puede estar unido en cualquier sitio a lo largo de la longitud de la sonda.

10 Como se usa en la presente memoria, "amortiguador oscuro" se refiere a un amortiguador no fluorescente.

Como se usa en la presente memoria, "sonda" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de formar una estructura doble con una secuencia en un ácido nucleico diana, debido a la complementariedad de al menos una secuencia de la sonda con una secuencia en la región diana, o región que se va a detectar. El término "sonda" incluye un oligonucleótido como se ha descrito antes, con o sin un fluoróforo y una molécula amortiguadora unidos. La expresión "sonda fluorescente" se refiere a una sonda que comprende un fluoróforo y una molécula amortiguadora.

15 Como se usa en la presente memoria, "FAM" se refiere al fluoróforo 6-carboxifluoresceína.

Como se usa en la presente memoria, "FAM" se refiere al fluoróforo 6-carboxifluoresceína.

Otras realizaciones de la descripción usan diferentes secuencias de oligonucleótidos para unirse a la región de genes E6/E7 del HPV. Los oligonucleótidos descritos en la presente memoria tienen una secuencia que es capaz de unirse a la secuencia de ácido nucleico diana (y su cadena complementaria). Los oligonucleótidos descritos en la presente memoria también se pueden usar, sea solo o en combinación, para facilitar la detección a través de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico de genes E6/E7 del HPV. En una realización, las sondas se diseñan para llevar a cabo un ensayo de PCR en tiempo real de Taq-Man® en la parte diana del gen. Los ejemplos de tres conjuntos de sondas degenerados usados para los ensayos de PCR en tiempo real de Taq-Man®, descritos en términos de sus secuencias de oligonucleótidos, se describen a continuación.

20

25 Específicamente, en la primera realización donde el primer conjunto de cebadores/sondas degenerado es para los tipos de HPV 39 y 68, el conjunto de cebadores/sondas que prefiere el HPV de tipo 39 son los SEQ ID NO: 1, 3 y 5. El conjunto de cebadores/sondas que prefiere el HPV de tipo 68 son los SEQ ID NO: 2, 4 y 6. Los SEQ ID NO: 1 y 2 son ambos cebadores directos Taq-Man y son degenerados entre sí. Los SEQ ID NO: 3 y 4 son ambos cebadores inversos Taq-Man y son degenerados entre sí. Los SEQ ID NO: 5 y 6 son ambos sondas Taq-Man y son degeneradas entre sí. Los conjuntos de cebadores/sondas degenerados para los HPV de tipos 33 y 58 son de SEQ ID NO: 7-16, que incluyen dos secuencias de cebadores inversos alternativas, siendo preferidos los SEQ ID NO: 13 y 14. Los conjuntos de cebadores/sondas degenerados para los HPV de tipo 56 y 66 son los SEQ ID NO: 17-23. Las secuencias de cebadores/sondas que seleccionan o discriminan el serotipo de HPV 51 son los SEQ ID NO: 24-29. Las secuencias de cebadores/sondas que seleccionan o discriminan el HPV de tipo 59 son los SEQ ID NO: 30-35.

30

35 Todas las secuencias a las que se ha hecho referencia antes están indicadas en la siguiente tabla 1. En la siguiente tabla, "D" es detector, "FP" es cebador directo y "RP" es cebador inverso.

Tabla 1

SEQ ID NO	Nombre	Descripción	Secuencia del oligonucleótido: 5'-3'
SEQ ID NO: 1	GR39_68E6 FP2 (39)	HPV 39 E6 Taq-Man Cebador directo	CCACTAGCTGCATGCCAATC
SEQ ID NO: 2	GR39_68E6 FP2 (68)	HPV 68 E6 Taq-Man Cebador directo	CCATTAGCTGCATGCCAATC
SEQ ID NO: 3	GR39_68E6 RP4 (39)	HPV 39 E6 Taq-Man Cebador inverso	CTAATGTAGTTGCATACACCGA
SEQ ID NO: 4	GR39_68E6 RP4 (68)	HPV 68 E6 Taq-Man Cebador inverso	CTAATGTTGTTGCATACACCGA
SEQ ID NO: 5	GR39_68D5 (39)	HPV 39 E6 Taq-Man Sonda	GAGTAATATCGTAGCTCCCGTATTTT
SEQ ID NO: 6	GR39_68D5 (68)	HPV 68 E6 Taq-Man Sonda	GAGTAATATCGTAGTTCCCGTATTTT
SEQ ID NO: 7	GR33_58FP2 (33)	HPV 33 E6 Taq-Man Cebador directo	TGTGCCAAGCATTGGAGACA

ES 2 665 465 T3

SEQ ID NO	Nombre	Descripción	Secuencia del oligonucleótido: 5'-3'
SEQ ID NO: 8	GR33_58FP2 (58)	HPV 58 E6 Taq-Man Cebador directo	TGTGTCAGGCGTTGGAGACA
SEQ ID NO: 9	GR33_58RP2 (33)	HPV 33 E6 Taq-Man Cebador inverso	CAAATGGATTTCCCTCTCTATA
SEQ ID NO: 10	GR33_58RP2 (58)	HPV 58 E6 Taq-Man Cebador inverso	CAAATGGATTTCCATCTCTATA
SEQ ID NO: 11	GR33_58RP3 (33)	HPV 33 E6 Taq-Man Cebador inverso	CCTCTCTATATACTAACTGTTAAA
SEQ ID NO: 12	GR33_58RP3 (58)	HPV 58 E6 Taq-Man Cebador inverso	CCATCTCTATACTATTCTTAAA
SEQ ID NO: 13	GR33_58RP4 (33)	HPV 33 E6 Taq-Man Cebador inverso	AAATGGATTTCCCTCTCTATATAC
SEQ ID NO: 14	GR33_58RP4 (58)	HPV 58 E6 Taq-Man Cebador inverso	AAATGGATTTCCATCTCTATACAC
SEQ ID NO: 15	GR33_58D1 (33)	HPV 33 E6 Taq-Man Sonda	TCATATACCTCAGATCGTTGCAAAG
SEQ ID NO: 16	GR33_58D1 (58)	HPV 58 E6 Taq-Man Sonda	TCATATACCTCAGATCGCTGCAAAG
SEQ ID NO: 17	MP56_66FP (56)	HPV 56 E7 Taq-Man Cebador directo	ACCTAATACACGTACCTTGTT
SEQ ID NO: 18	MP56_66FP (66)	HPV 66 E7 Taq-Man Cebador directo	ACCTAATTCACGTACCTTGTT
SEQ ID NO: 19	MP56_66RP (56)	HPV 56 E7 Taq-Man Cebador inverso	ACACGCAGGTCCTCTTTGGT
SEQ ID NO: 20	MP56_66RP (66)	HPV 66 E7 Taq-Man Cebador inverso	ACACGTAGCTCCTCTTTGGT
SEQ ID NO: 21	MP56_66D (56)	HPV 56 E7 Taq-Man Sonda	TGTAAGTTTGTGGTGCAGTTGGACA
SEQ ID NO: 22	MP56_66D (66.1)	HPV 66 E7 Taq-Man Sonda	TGTGAGCTTGTGGTGCAGTTGGACA
SEQ ID NO: 23	MP56_66D (66.2)	HPV 66 E7 Taq-Man Sonda	TGTGAGTTGGTGGTGCAGTTGGACA
SEQ ID NO: 24	51E6 FP	HPV 51 E6 Cebador directo	GCAGTATGCAAACAATGTTAC
SEQ ID NO: 25	51E6 RP	HPV 51 E6 Cebador inverso	TAGTAATTGCCTCTAATGTAGTA
SEQ ID NO: 26	51E6 D	HPV 51 E6 Taq-Man Sonda	CCTGCTATAACGTCTATACTCTCTA
SEQ ID NO: 27	51E7 FP	HPV 51 E7 Cebador directo	CTCAGAGGAGGAGGATGAAG
SEQ ID NO: 28	51E7 RP	HPV 51 E7 Cebador inverso	TGAACACCTGCAACACGGAG
SEQ ID NO: 29	51E7 D	HPV 51 E7 Taq-Man Sonda	CTACCAGAAAGACGGGCTGGAC
SEQ ID NO: 30	59E6 FP	HPV 59 E6 Cebador directo	GGAGAAACATTAGAGGCTGAA
SEQ ID NO: 31	59E6 RP	HPV 59 E6 Cebador inverso	ATAGAGGTTTTAGGCATCTATAA
SEQ ID NO: 32	59E6 D	HPV 59 E6 Taq-Man Sonda	ACCGTTACATGAGCTGCTGATACG

SEQ ID NO	Nombre	Descripción	Secuencia del oligonucleótido: 5'-3'
SEQ ID NO: 33	59E7 FP	HPV 59 E7 Cebador directo	GAAGTTGACCTTGTGTGCTAC
SEQ ID NO: 34	59E7 RP	HPV 59 E7 Cebador inverso	ATTA ACTCCATCTGGTTCATCTT
SEQ ID NO: 35	59E7 D	HPV 59 E7 Taq-Man Sonda	ATTACCTGACTCCGACTCCGAGAA
SEQ ID NO: 36	Región diana para conjuntos de cebadores/sondas degenerados para HPV de tipos 39 y 68	91 nucleótidos Región diana	CCATTAGCTGCATGCCAATCATGTATTA AATTTTATGCTAAAATACGGGAACCTACG ATATTACTCAGAATCGGTGTATGCAACA ACATTAG
SEQ ID NO: 37	Región diana para conjuntos de cebadores/sondas degenerados para HPV tipos 33 y 58	138 nucleótidos Región diana	TGTGCCAAGCATTGGAGACAACATAACA CAACATTGAACTACAGTGCCTGGAATGC AAAAAGACTTTGCAACGATCTGAGGTAT ATGATTTTGCATTTGCAGATTTAACAGT TGTATATAGAGAGGGAAATCCATTTG
SEQ ID NO: 38	Región diana para conjuntos de cebadores/sondas degenerados para HPV tipos 56 y 66	79 nucleótidos Región diana	ACCTAATACACGTACCTTGTGTGTXAGTG TAAGTTTGTGGTGCAGTTGGACATTTCAG AGTACCAAAGAGGACCTGCGTGT

Las ubicaciones de las regiones diana para los conjuntos de cebadores/sondas descritos en la tabla anterior se describen en la siguiente tabla 1A:

Tabla 1A: Ubicación de las regiones diana

Genotipo	Nº de acceso en GenBank	Coordenadas de la región diana
39	M62849	287-377
68	EU918769	181-271
33	M12732	152-288
58	D90400	153-289
56	X74483	747-825
66	EF177190	747-825

5 Aunque hay una homología de secuencia entre las regiones diana para los conjuntos de cebadores/sondas degenerados, las coordenadas de estas regiones dependen del genotipo.

10 En una realización adicional, el método incluye tratar una muestra usando al menos un conjunto de cebadores/sondas degenerado para seleccionar dos tipos de HPV estrechamente relacionados y un conjunto de cebadores/sondas que discrimina un tercer tipo de HPV, donde el resto señal para las sondas degeneradas emite una señal de la misma longitud de onda y, preferiblemente, es el mismo resto de señalización para las dos sondas degeneradas. El resto de señalización del conjunto de cebadores/sondas que discrimina el tercer tipo de HPV emite señal a una longitud de onda que es diferente, y por lo tanto detectable por separado, de la longitud de onda emitida por los restos de señalización para las sondas degeneradas. Estos conjuntos de cebadores/sondas se usan en una  
15 reacción de amplificación de ácido nucleico para detectar la presencia o ausencia del producto de ácido nucleico amplificado.

20 En otra realización, se proporciona un kit para la detección del HPV. El kit incluye al menos un conjunto de cebadores/sondas degenerado que selecciona dos tipos de HPV diferentes pero estrechamente relacionados y un conjunto de cebadores/sondas que discrimina un tercer tipo de HPV, donde el resto señal para las sondas degeneradas emite una señal a la misma longitud de onda y, preferiblemente, es el mismo resto de señalización para las dos sondas degeneradas. El resto de señalización del conjunto de cebadores/sondas que discrimina el tercer tipo de HPV emite señal a una longitud de onda que es diferente, y por lo tanto detectable por separado, de la longitud de onda emitida por los restos de señalización para las sondas degeneradas. Los conjuntos de cebadores/sondas son capaces de amplificar una secuencia diana que se puede usar para la detección de ese  
25 organismo. El kit está provisto de uno o más de los oligonucleótidos y de reactivos de tamponamiento para llevar a cabo los ensayos de amplificación.

En otro aspecto más del kit, se pueden proporcionar los oligonucleótidos y reactivos para los fines de PCR de Taq-Man. En este aspecto, se proporcionan tres oligonucleótidos. Dos de los tres son cebadores de amplificación y el tercer oligonucleótido está configurado como un detector.

**Breve descripción de los dibujos**

5 La figura 1 ilustra la región diana del gen E6 para el HPV de tipo 68, y esquemáticamente la degeneración de esta secuencia diana entre diferentes mutaciones del HPV de tipo 68, HPV de tipo 39 y mutaciones del HPV de tipo 39 junto con el conjunto de cebadores/sondas degenerado para los HPV de tipos 39 y 68;

10 La figura 2A-B ilustra la región diana del gen E6 para el HPV de tipo 33, y esquemáticamente la degeneración de esta secuencia diana entre diferentes mutaciones del HPV de tipo 33, HPV de tipo 58 y mutaciones del HPV de tipo 33 junto con el conjunto de cebadores/sondas degenerado para los HPV de tipos 33 y 58; y

La figura 3 ilustra la región diana del gen E7 para el HPV de tipo 66, y esquemáticamente la degeneración de esta secuencia diana entre diferentes mutaciones del HPV de tipo 66, HPV de tipo 56 y mutaciones del HPV de tipo 56 junto con el conjunto de cebadores/sondas degenerado para los HPV de tipos 56 y 66.

**Descripción detallada de la invención**

15 Las sondas y conjuntos de sondas de oligonucleótidos descritos en la presente memoria se diseñan específicamente para seleccionar o discriminar entre tipos de HPV. Específicamente, se combinan conjuntos de cebadores/sondas degenerados que son algo selectivos para uno de dos tipos de HPV estrechamente relacionados, con al menos otro conjunto de cebadores/sondas que discrimina un tercer tipo más de HPV que es diferente de los tipos de HPV estrechamente relacionados.

20 Los conjuntos de cebadores/sondas proporcionan una señal detectable cuando el tipo específico de HPV está presente en la muestra.

En las realizaciones preferidas, se usa el método de detección de PCR (p. ej., PCR de Taq-Man) aunque también están contemplados otros métodos (p. ej., TMA y LCR). Además, se describe un kit para detectar más tipos de HPV que canales de detección hay.

25 En relación con la figura 1, los conjuntos de cebadores/sondas degenerados específicos para tipos de HPV se describen en términos de su alineamiento con la región diana ilustrada del gen E6. La figura 1 ilustra la región de cebador directo 10, la región de detección Taq-Man 20 y la región de cebador inverso 30. La figura 1 también ilustra los cebadores directos degenerados 11, 12, cebadores inversos degenerados 31, 32, y sondas degeneradas 21 y 22 en relación con su correspondiente región en la secuencia diana 40. Solo las variaciones en la secuencia diana 40 con respecto a la región de cebador directo, región de cebador inverso y regiones de detector se ilustran en los recuadros 60, 70 y 80. Se indica la degeneración de secuencia entre estas regiones y a partir de esto se puede observar que estas regiones son menos deseables debido a la mayor variación de secuencia en estas regiones.

30 Por ejemplo, en el recuadro 60 obsérvese que hay polimorfismos de un solo nucleótido (T, C) entre la parte de la secuencia diana 40 delimitada por el recuadro 60 y la misma parte de E6 de una diana de HPV de tipo 39. Los recuadros 60, 70 y 80 ilustran los polimorfismos de nucleótido con respecto a la diana para diferentes cepas de HPV de tipos 68 y 39. Estas cepas diferentes y el número y situación de los polimorfismos de nucleótido (con respecto a la diana) se dan en la tabla 2.

Tabla 2: Polimorfismos ilustrados en la figura 1 con respecto a la diana

Tipo/cepa	Número de polimorfismos (sitio desde 5')
Tipo 68	
68_A7_High_45240-DQ80079. seq	3 [T(en 6); G(en 66); T(en 84)]
68_A7_High_45240-EU918769.seq	Ninguno
BD115-68 900bp.seq	3 [C(en 21); A(en 46); C(en 81)]
BD-637-68 900 bp.seq	1 [G(en 31)]
T276-68 900bp.seq	Ninguno
T1177-68 900bp.seq	3 [T o C (en 6); C(en 81); T o T(en 84)]
T1610-68 900bp 071309.seq	2 [G(en 53); C(en 81)]

## ES 2 665 465 T3

Tipo 39	
23, A7, High, 10568, M62849.seq	6 [C(en 4); A(en 27) ; G (en 51) G(en 66); C(en 69); T(en 84)]
S492-39 900bp.seq	8 [T(en 3) ; C(en 4) ; A(en 27) ; G(en 51) G(en 66) ; C(en 69); G(en 80) ; T(en 84)]
T296-39 900bp.seq	7[C(en 4) ; A(en 27) ; G(en 51) ; C(en 57); G(en 66); C(en 69); T(en 84)]

El cebador directo 11 para HPV 39 tiene un polimorfismo de un solo nucleótido y por lo tanto está degenerado con respecto al cebador directo 12 para HPV 68. El cebador directo 11 es el SEQ ID NO: 1 y el cebador directo 12 es el SEQ ID NO: 2. La degeneración entre las dos secuencias se observa fácilmente:

5 CCACTAGCTGCATGCCAATC

CCATTAGCTGCATGCCAATC

La respectiva degeneración está indicada por subrayado.

La degeneración hace que el cebador directo prefiera unirse al HPV de tipo 39 y el cebador directo 12 prefiera unirse al HPV de tipo 68. Los conjuntos de cebadores/sondas degenerados prefieren unirse a la diana de un tipo de HPV frente al otro tipo, pero no discriminan. En términos de figuras, los conjuntos de cebadores/sondas se describen en relación con la diana. Los recuadros 60, 70 y 80 contienen información sobre la degeneración entre HPV de tipos 39 y 68 con respecto a la región diana 40 delimitada por los recuadros 60, 70 y 80. Esto es una referencia de situación y no una referencia de hibridación. Específicamente, los cebadores inversos 31 y 32 (SEQ ID NO: 3 y 4) tienen secuencias que son el complemento inverso de la secuencia en su correspondiente sitio en la diana 40. De forma similar, las sondas detectoras 21 y 22 (SEQ ID NO: 5 y 6) son el complemento inverso de la secuencia en su sitio correspondiente en la diana 40. Los cebadores directos 11 y 12 (SEQ ID NO: 1 y 2) son homólogos a la secuencia en su correspondiente sitio en la diana 40.

Las figuras 2A-B son similares a la figura 1, pero para los conjuntos de cebadores/sondas degenerados que seleccionan HPV de tipos 33 y 58. Los recuadros 160, 170 y 180 ilustran los polimorfismos de nucleótidos con respecto a la diana para diferentes cepas de HPV de tipos 33 y 58. Estas cepas diferentes y el número y sitio de los polimorfismos de nucleótido (respecto a la diana) se dan en la tabla 3. El sitio de los polimorfismos se ilustra en la figura 2.

Tabla 3: Polimorfismos ilustrados en las figuras 2A-B con respecto a la diana

Tipo/Cepa	Número de polimorfismos
Tipo 33	
33_A9_High_10586 EF422125.seq	3 [C(en 30); A(en 62) ; C(en 63)]
33_A9_High_10586 EF422126.seq	3 [C(en 62); C(en 63) ; T(en 52)]
33_A9_High_10586 EF566920.seq	3 [C(en 62) ; C(en 63) ; A(en 99)]
33_A9_High_10586 EF566921.seq	2 [C(en 62) ; C(en 63)]
33_A9_High_10586 EF918766.seq	4 [G(en 58);C(en 62);C(en 63); G(en 122)]
33_A9_High_10586 G0374550.seq	1 [A(en 62)]
33_A9_High_10586 GO374551.seq	2 [G(en 54) ; A(en 62)]
33_A9_High_10586 GO374552.seq	2 [T(en 10) ; A(en 62)]
33_A9_High_10586 M12732.seq	2 [A(en 62) ; C(en 63)]
BD670 grp33 900bp.seq	1 [A(en 62)]
BD783-33 900bp.seq	3 [C(en 62); C(en 63); C(en 92)]
BD783-33 clone 900bp.seq	2 [C(en 62); C(en 63)]
TI093-33 900bp.seq	2 [G(en 54) ; A(en 62)]

Tipo 58	
HPV_58 D60400.seq	23 [Véase las figuras 2A-B para el sitio]
T-275-58 900bp.seq	22 [Véase las figuras 2A-B para el sitio]
T-276-58 900bp.seq	24 [Véase las figuras 2A-B para el sitio]
T-817-58 clone 900bp.seq	23 [Véase las figuras 2A-B para el sitio]
58_A9 High E6 10598 AF478160	23 [Véase las figuras 2A-B para el sitio]
58_A9 High E6 10598 AF478167	22 [Véase las figuras 2A-B para el sitio]
58_A9 High E6 10598 AF234531	23 [Véase las figuras 2A-B para el sitio]
58_A9 High E6 10598 AF478157	23 [Véase las figuras 2A-B para el sitio]
58_A9 High E6 10598 EU080239	25 [Véase las figuras 2A-B para el sitio]
58_A9 High E6 10598 FJ407192	24 [Véase las figuras 2A-B para el sitio]
58_A9 High E6 10598 GO248229	23 [Véase las figuras 2A-B para el sitio]
58_A9 High E6 10598 GO248253	22 [Véase las figuras 2A-B para el sitio]

5 Las figuras 2A-B ilustran la región de cebador directo 110, la región de detección Taq-Man 120 y la región de cebador inverso 130. Las figuras 2A-B también ilustran los cebadores directos degenerados 111, 112, cebadores inversos degenerados 131, 132 y sondas degeneradas 121 y 122 en relación con su región correspondiente en la secuencia diana 140. Solo se ilustran las variaciones en la secuencia diana 140 con respecto a la región de cebador directo, región de cebador inverso y regiones de detector en los recuadros 160 (fig. 2A), 170 y 180 (fig. 2B).

10 Por ejemplo, en el recuadro 160 obsérvese que hay polimorfismos de un solo nucleótido (T, G, G) entre la parte de la secuencia diana 140 delimitada por el recuadro 60 y la misma parte de E6 de una diana de HPV de tipo 33. Sin embargo, el cebador directo 112 para HPV 58 tiene tres polimorfismos de un solo nucleótido y por lo tanto es degenerado con respecto al cebador directo 111 para HPV 33. El cebador directo 111 es el SEQ ID NO: 7 y el cebador directo 112 es el SEQ ID NO: 8. La degeneración entre las dos secuencias se observa fácilmente:

TGTGCCAAGCATTGGAGACA

TGTGTCAGGCGTTGGAGACA

La degeneración respectiva se indica por subrayado.

15 La degeneración hace que el cebador directo 111 prefiera unirse al HPV de tipo 33 y el cebador directo 112 prefiera unirse al HPV de tipo 58. Los conjuntos de cebadores/sondas degenerados prefieren unirse a la diana de un tipo de HPV respecto al otro tipo pero no discriminan. En términos de las figuras, los conjuntos de cebadores/sondas se describen en relación con la diana. Los recuadros 160, 170 y 180 contienen información sobre la degeneración entre los HPV de tipos 33 y 58 con respecto a la región diana 140 delimitada por los recuadros 160, 170 y 180. Esto es una referencia de sitio y no referencia de hibridación. Específicamente, los cebadores inversos 131 y 132 (p. ej., SEQ ID NO: 13 y 14) tienen secuencias que son el complemento inverso de la secuencia en su correspondiente sitio en la diana 140. De forma similar, las sondas inversas 121 y 122 (SEQ ID NO: 15 y 16) son el complemento inverso de la secuencia en su sitio correspondiente en la diana 140. Los cebadores directos 111 y 112 (SEQ ID NO: 7 y 8) son homólogos a la secuencia en su correspondiente sitio en la diana 140.

25 La figura 3 es similar a las figuras 1 y 2, salvo por los conjuntos de cebadores/sondas degenerados para los HPV de tipos 56 y 66. La figura 3 ilustra la región del cebador directo 210, la región de detección Taq-Man 220 y la región de cebador inverso 230. Los recuadros 260, 270 y 280 ilustran los polimorfismos de nucleótido con respecto a la diana para diferentes cepas de HPV de tipos 66 y 56. Estas cepas diferentes y el número y sitio de los polimorfismos de nucleótido (con respecto a la diana) se describen en la tabla 2.

30

Tabla 4: Polimorfismos ilustrados en la figura 3 respecto a la diana

Tipo/Cepa	Número de polimorfismos (sitio desde 5')
Tipo 66	
66_A6_High_37119-EF177191	6 [T(en 8); A(en 24); G(en 30) C(en 33); G(en 71); A(en 74)]
66_A6_High_37119-EF177188	7 [T(en 8); T(en 9); A(en 24); G(en 30) C(en 33); G(en 71); A(en 74)]
66_A6_High_37119-EF177186	6 [T(en 8); A(en 24); G(en 30) G(en 35); G(en 71); A(en 74)]
Tipo 56	
56_A6_High_37119-EF177176	2 [G(en 24); C(en 56)]
56_A6_High 37119-EF177178	3 [C(en 20); C(en 23); C(en 24)]
56 A6_High 37119-EF177179	1 [C(en 24)]
56_A6_High 37119-EF177180	1 [G(en 24)]
BD616grp56 E7	3 [G(en 24);T(en 54); C(en 56)]
T1631-56 E7	1 [A(en 24)]

La figura 3 también ilustra los cebadores directos degenerados 211, 212, cebadores inversos degenerados 231, 232 y sondas degeneradas 221 y 222 con respecto a su región correspondiente en la secuencia diana 240. Solo se ilustran las variaciones en la secuencia diana 240 con respecto a la región de cebador directo, región de cebador inverso y regiones de detector en los recuadros 260, 270 y 280.

Por ejemplo, en el recuadro 260 obsérvese que hay dos polimorfismos de un solo nucleótido (T, C) entre la parte de la secuencia diana 240 delimitada por el recuadro 260 y entre la diana de HPV 66 y una diana de HPV 56. Sin embargo, el cebador directo 211 para HPV 56 tiene un polimorfismo de un solo nucleótido y por lo tanto es degenerado con respecto al cebador directo 211 para HPV 66. El cebador directo 211 es el SEQ ID NO: 17 y el cebador directo 212 es el SEQ ID NO: 18. La degeneración entre las dos secuencias se observa fácilmente:

ACCTAATACACGTACCTTGTT

ACCTAATTCACGTACCTTGTT

La degeneración respectiva se indica por subrayado.

La degeneración hace que el cebador directo 211 prefiera unirse al HPV de tipo 56 y el cebador directo 212 prefiera unirse al HPV de tipo 66. Los conjuntos de cebadores/sondas degenerados prefieren unirse a la diana de un tipo de HPV respecto al otro tipo pero no discriminan. En términos de las figuras, los conjuntos de cebadores/sondas se describen en relación con la diana. Los recuadros 260, 270 y 280 contienen información sobre la degeneración entre los HPV de tipos 56 y 66 con respecto a la región diana 240 delimitada por los recuadros 260, 270 y 280. Esto es una referencia de sitio y no referencia de hibridación. Específicamente, los cebadores inversos 231 y 232 (SEQ ID NO: 19 y 20) tienen secuencias que son el complemento inverso de la secuencia en su correspondiente sitio en la diana 240. De forma similar, las sondas 221 y 222 (SEQ ID NO: 22 y 23) son el complemento inverso de la secuencia en su sitio correspondiente en la diana 240. Los cebadores directos 211 y 212 (SEQ ID NO: 17 y 18) son homólogos a la secuencia en su correspondiente sitio en la diana 140. Aunque no se describe específicamente, la degeneración entre los cebadores inversos y sondas en los conjuntos de cebadores y sondas degenerados se observa fácilmente.

Además de los ejemplos de conjuntos de cebadores/sondas degenerados descritos en la presente memoria, el experto en la técnica, basado en la descripción de la presente memoria y las figuras que acompañan, podría identificar otras regiones diana de serotipos estrechamente relacionados para los que se podrían diseñar conjuntos de cebadores/sondas degenerados. Como se observa fácilmente por las figuras, las regiones diana deseables tendrán pocos polimorfismos entre los serotipos individuales. Aquellos polimorfismos que están presentes se pueden abordar en el diseño del conjunto de cebadores/sondas degenerados de acuerdo con la forma descrita en la presente memoria.

Como se describe a continuación, los cebadores y sondas pueden unirse a secuencias diana incluso aunque sean menos de 100% complementarias con esas regiones. El grado de complementariedad necesario depende de una variedad de factores que incluyen las condiciones restrictivas de la unión. Dependiendo de las condiciones

restrictivas usadas, los cebadores y sondas se pueden modificar para incluir diferentes bases en su secuencia y ser todavía suficientemente complementarias para unirse a la región diana del ácido nucleico. Suficientemente complementaria, como se usa en la presente memoria incluye complementariedad de 70% o más. En realizaciones preferidas, la complementariedad de los cebadores/sondas con su secuencia diana es al menos 80% a lo largo de la longitud de la parte de unión de los cebadores/sondas. Más preferiblemente, la complementariedad de los cebadores y sondas con sus secuencias diana es 90% o más.

Dicho de otra forma, la presente invención contempla cebadores y sondas que tienen al menos 70% de homología con los cebadores y sondas identificados específicamente en la presente memoria por el SEQ ID. En realizaciones preferidas, están contemplados los cebadores/sondas que tienen al menos 80% de homología con los cebadores y sondas específicamente identificados por el SEQ ID en la presente memoria. Más preferiblemente, están contemplados los cebadores/sondas que tienen al menos 90% de homología con los cebadores y sondas específicamente identificados por el SEQ ID en la presente memoria.

Aunque los oligonucleótidos descritos en la presente memoria deben ser suficientemente complementarios para unir sus partes respectivas de la diana de HPV para la que discriminan, se reconoce en algún momento que la secuencia del oligonucleótido se hace menos complementaria a su diana y se puede unir a otras secuencias de ácido nucleico. Por lo tanto, es deseable que las sondas de oligonucleótidos permanezcan suficientemente complementarias con su parte respectiva del gen diana y no pierdan selectividad por su respectivo sitio de unión a la diana.

La secuencia de unión a la diana dentro del cebador de amplificación de oligonucleótido en general puede estar situado en su extremo 3'. La secuencia de unión a la diana puede ser de aproximadamente 10-25 nucleótidos de longitud y puede tener especificidad de hibridación con el cebador de amplificación. Por lo tanto, se entiende que un experto en la técnica puede cambiar la secuencia de unión a la diana para cambiar eficazmente la especificidad de hibridación del cebador de amplificación y dirigir la hibridación a una secuencia alternativa.

Un experto en la técnica entiende que los oligonucleótidos usados en los ensayos de amplificación se pueden modificar en alguna medida sin pérdida de la utilidad o especificidad hacia una secuencia diana. Por ejemplo, como se conoce en la técnica, la hibridación de secuencias de ácido nucleico complementarias y parcialmente complementarias se puede obtener mediante el ajuste de las condiciones de hibridación para aumentar o disminuir las condiciones de restricción (es decir, ajuste de la temperatura de hibridación o el contenido de sal del tampón). Dichas modificaciones minoritarias de las secuencias descritas y cualquier ajuste necesario de las condiciones de hibridación para mantener la especificidad con la diana, solo requieren experimentación rutinaria y son conocidas para el experto en la técnica.

Como una guía general en el diseño de oligonucleótidos útiles como cebadores, la  $T_m$  disminuye aproximadamente 1°C-1,5°C con cada 1% de disminución de homología de secuencia. Los intervalos de temperatura pueden variar entre aproximadamente 60°C y 70°C, pero los cebadores se pueden diseñar para ser óptimos a 60°C  $\pm$  4°C y las sondas se pueden diseñar para ser óptimas a 70°C  $\pm$  4°C. Una consideración más cuando se diseñan los cebadores de amplificación puede ser el contenido de guanina y citosina. En general, el contenido de GC para un cebador puede ser aproximadamente 60-70%, pero también puede ser menor y los puede ajustar de forma adecuada el experto en la técnica. La reasociación de secuencias de ácido nucleico complementarias y parcialmente complementarias se puede obtener modificando las condiciones de reasociación para aumentar o disminuir la restricción (es decir, ajustar la temperatura de reasociación o el contenido de sal del tampón). Las modificaciones tales como las de las secuencias descritas y cualquier ajuste necesario de las condiciones de reasociación para mantener la especificidad del gen requieren solo experimentación rutinaria y son conocidas para el experto en la técnica.

Las reacciones de amplificación que usan los cebadores descritos en la presente memoria pueden incorporar timina como enseñan Walker et al., véase antes, o pueden sustituir total o parcialmente el TTP por 5'-trifosfato de 2'-desoxiuridina en la reacción para reducir la contaminación cruzada de reacciones de amplificación posteriores, p. ej., como se enseña en el documento EP 0624643. La dU (uridina) se incorpora en los productos de amplificación y se puede escindir por tratamiento con uracil-ADN glicosilasa (UDG). Estos sitios no básicos hacen que el producto de amplificación no sea amplificable en posteriores reacciones de amplificación. La UDG puede ser inactivada por el inhibidor de la uracil-ADN glicosilasa (Ugi) antes de llevar a cabo la posterior amplificación para prevenir la escisión de la dU en los productos de amplificación recién formados.

Se usa la ADN polimerasa de la PCR contemplada para usar en la presente invención, que tiene actividad de exonucleasa 5'-3' (p. ej., Sequencing Grade Taq de Promega o Deep Vent<sub>R</sub><sup>TM</sup> (exo-) DNA de New England BioLabs). La sonda hibrida con la diana en la dirección 3' de los cebadores de amplificación de la PCR. La sonda se desplaza a medida que la síntesis de la endonucleasa en la dirección 3' avanza desde los cebadores entre los que está dispuesta la sonda. Puesto que el termociclado es una característica de la amplificación por PCR, la endonucleasa de restricción se añade preferiblemente a baja temperatura después del ciclo final de reasociación del cebador y extensión para la detección del punto final de la amplificación. Sin embargo, podría estar presente una endonucleasa de restricción termófila que permanece activa a lo largo de las fases de alta temperatura de la reacción de PCR, durante la amplificación para proporcionar un ensayo en tiempo real. La linearización de la estructura secundaria y separación de la pareja del colorante reduce la amortiguación de la fluorescencia, con un cambio en un parámetro

de fluorescencia tal como la intensidad, que sirve como una indicación de la amplificación de la diana.

El cambio en la fluorescencia que da como resultado el desplegado o la linearización de los oligonucleótidos detectores, se puede detectar en un punto final seleccionado en la reacción. Sin embargo, debido a que se producen estructuras secundarias linearizadas simultáneamente con la hibridación o extensión del cebador, también se puede vigilar el cambio en la fluorescencia a medida que ocurre la reacción, es decir, en "tiempo real". Este formato de ensayo en tiempo real, homogéneo, se puede usar para proporcionar información semicuantitativa o cuantitativa sobre la cantidad inicial de diana presente. Cuando están presentes más copias iniciales de la secuencia diana, la fluorescencia del donador alcanza más rápidamente un valor umbral seleccionado (p. ej., tiempo más corto para positividad). La disminución en la fluorescencia del aceptor presenta de forma similar un tiempo más corto para la positividad, detectado como el tiempo necesario para alcanzar un valor mínimo seleccionado. Además, la velocidad de cambio de los parámetros de fluorescencia durante el curso de la reacción es más rápido en muestras que contienen cantidades iniciales mayores de diana que en muestras que contienen cantidades iniciales menores de diana (es decir, mayor pendiente de la curva de fluorescencia). Se pueden hacer estas u otras mediciones como se conoce en la técnica como una indicación de la presencia de diana o como una indicación de la amplificación de la diana. La cantidad inicial de diana típicamente se determina por comparación de los resultados experimentales con los resultados para cantidades conocidas de diana.

Los ensayos para la presencia de una secuencia diana seleccionada de acuerdo con los métodos de la invención, se pueden llevar a cabo en solución o en una fase sólida. Los ensayos homogéneos en tiempo real o de punto final en los que el oligonucleótido detector funciona como un cebador se llevan a cabo típicamente en solución. También se pueden llevar a cabo ensayos de hibridación usando oligonucleótidos detectores de la invención en solución (p. ej., como ensayos en tiempo real homogéneos) pero también son particularmente adecuados los ensayos en fase sólida para la detección en tiempo real o de punto final de la diana. En un ensayo en fase sólida, los oligonucleótidos detectores se pueden inmovilizar en la fase sólida (p. ej., perlas, membranas o el recipiente de reacción) mediante marcadores internos o terminales usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un oligonucleótido detector marcado con biotina se puede inmovilizar en una fase sólida modificada con avidina donde producirá un cambio en la fluorescencia cuando se expone a la diana en las condiciones de hibridación adecuadas. La captura de la diana de esta forma facilita la separación de la diana de la muestra y permite la eliminación de sustancias en la muestra que pueden interferir con la detección de la señal u otros aspectos del ensayo.

Por conveniencia comercial, los oligonucleótidos útiles para la detección e identificación específica de ácidos nucleicos de HPV se pueden envasar en forma de un kit. Típicamente, dicho kit contiene al menos un oligonucleótido descrito en la presente memoria. Los reactivos para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico también se pueden incluir con los oligonucleótidos específicos para el HPV. Por ejemplo, se pueden incluir tampones, otros oligonucleótidos, trifosfatos de nucleótidos, enzimas, etc. Los componentes del kit se pueden envasar juntos en un recipiente común. Opcionalmente se pueden incluir instrucciones que ilustren una realización descrita para llevar a cabo una realización específica de los métodos de la invención. También se pueden incluir otros componentes opcionales en el kit, p. ej., un oligonucleótido marcado con un marcador adecuado para usar como una sonda de ensayo y/o reactivos o medios para detectar el marcador.

Además, el kit puede incluir oligonucleótidos y reactivos en formato seco o líquido. Los componentes del kit pueden ser más estables y se pueden manipular más fácilmente cuando están en formato seco. Los componentes secos del kit se pueden añadir a o pretratar en una fase sólida tal como una placa de microvaloración, micromatriz u otro receptáculo adecuado, donde solo es necesario añadir la muestra y el tampón. Este formato facilita el ensayo de múltiples muestras simultáneamente y es útil en los métodos de alta capacidad. Se pueden usar los instrumentos BD ProbeTec™ y Viper™ XTR.

Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones específicas de la invención descrita en la presente memoria. Como será evidente para los expertos en la técnica, son posibles diferentes cambios y modificaciones, y están contemplados dentro del alcance de la invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

A continuación se describe con más detalle un sistema de PCR de Taq-Man para la detección del HPV, usando los conjuntos de cebadores/sondas de la tabla 1 como ejemplo. Los conjuntos de cebadores de los cebadores/sondas descritos en la tabla 1 anterior se diseñaron para llevar a cabo la PCR de Taq-Man para los HPV de tipos 39 y 68 y 51. Específicamente, en la primera realización donde el primer conjunto de cebadores/sondas degenerado es para el HPV de tipos 39 y 68, el conjunto de cebadores/sondas que prefiere el HPV de tipo 39 son los SEQ ID NO: 1, 3 y 5. El conjunto de cebadores/sondas que prefiere el HPV de tipo 68 son los SEQ ID NO: 2, 4 y 6.

La PCR en tiempo real de Taq-Man es un tipo de PCR cuantitativa. Taq-Man usa una sonda fluorogénica que es un oligonucleótido monocatenario de 20-26 nucleótidos y está diseñado para unirse solo a la secuencia de ADN entre los dos cebadores de la PCR. En Taq-Man, los colorantes indicadores y los colorantes amortiguadores están unidos a la sonda. La sonda se reasocia con el ADN alternando la temperatura para desnaturalizar y reasociar el ADN. La polimerasa Taq añade nucleótidos al ADN diana y esto separa la sonda Taq-Man del ADN molde. Cuando el colorante indicador se separa del colorante amortiguador, el colorante indicador emite energía que es detectable. La energía es cuantificada por un ordenador, que proporciona una señal que indica que se ha detectado la diana. Solo el producto de la PCR específico puede generar la señal fluorescente en la PCR de Taq-Man.

En el ejemplo de la presente memoria, está contemplado el ciclo térmico. Después de una etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 15 minutos, la mezcla de la PCR de conjuntos de cebadores/sondas y muestra para la detección de la presencia o ausencia de diana, se somete al ciclo térmico de 55°C durante 1 minuto seguido de 95°C durante 30 segundos durante cuarenta ciclos.

- 5 Para llevar a cabo la PCR de Taq-Man, se usan dos cebadores de PCR con un tamaño de producto preferido de 50-150 pares de bases y una sonda con un indicador fluorescente o fluoróforo (p. ej., 6-carboxifluoresceína (FAM) y tetraclorofluoresceína (TET)) y un amortiguador tal como tetrametilrodamina (TAMRA) o un amortiguador oscuro tal como se ha descrito previamente que se unen covalentemente a sus extremos 5' y 3'. Los indicadores fluorescentes y fluoróforos adecuados son bien conocidos y no se describen con detalle en la presente memoria.
- 10 Tabla 5: Ejemplos de conjuntos de sondas de PCR de Taq-Man para el ensayo Taq-Man de HPV de tipo 39, 68 y 51

SEQ ID NO:	Descripción de la sonda	Oligonucleótido secuencia 5' - 3'	Sitio en ORF (pb) Acceso en Genbank en ()
SEQ ID NO: 1	HPV 39 E6 Taq-Man Cebador directo	CCACTAGCTGCATGCCAATC	287-306 (M62849)
SEQ ID NO: 2	HPV 68 E6 Taq-Man Cebador directo	CCATTAGCTGCATGCCAATC	181-200 (EU918769)
SEQ ID NO: 3	HPV 39 E6 Taq-Man Cebador inverso	CTAATGTAGTTGCATACACCGA	356-377 (M62849)
SEQ ID NO: 4	HPV 68 E6 Taq-Man Cebador inverso	CTAATGTTGTTGCATACACCGA	250-271 (EU918769)
SEQ ID NO: 5	HPV 39 E6 Taq-Man Sonda	GAGTAATATCGTAGCTCCCGTATTTT	326-351 (M62849)
SEQ ID NO: 6	HPV 68 E6 Taq-Man Sonda	GAGTAATATCGTAGTTCCCGTATTTT	220-245 (EU918769)
SEQ ID NO: 24	HPV 51 E6 Cebador directo	GCAGTATGCAAACAATGTTTAC	277-298 (M62877)
SEQ ID NO: 25	HPV 51 E6 Cebador inverso	TAGTAATTGCCTCTAATGTAGTA	351-373 (M62877)
SEQ ID NO: 26	HPV 51 E6 Taq-Man Sonda	CCTGCTATAACGTCTATACTCTCTA	315-339 (M62877)
SEQ ID NO: 27	HPV 51 E7 Cebador directo	CTCAGAGGAGGAGGATGAAG	652-671 (M62877)
SEQ ID NO: 28	HPV 51 E7 Cebador inverso	TGAACACCTGCAACACGGAG	738-757 (M62877)
SEQ ID NO: 29	HPV 51 E7 Taq-Man Sonda	CTACCAGAAAGACGGGCTGGAC	692-713 (M62877)

Las sondas se diseñan para reasociarse con el sitio del ORF en el gen de HPV E6/E7 que se indica en la tabla. En

relación con esto, los sitios en el ORF para el conjunto de cebadores/sondas para HPV 59 tanto para el gen E6 como E7 se citan en la siguiente tabla.

Tabla 6: Sitios en el ORF en E6/E7 para el conjunto de cebadores/sondas para HPV de tipo 59

SEQ ID NO:	Descripción de la sonda	Oligonucleótido secuencia 5' - 3'	Sitio en ORF (pb) Acceso en Genbank en ()
SEQ ID NO: 30	HPV 59 E6 Cebador directo	GGAGAAACATTAGAGGCTGAA	313-333 (X77858)
SEQ ID NO: 31	HPV 59 E6 Cebador inverso	ATAGAGGTTTTAGGCATCTATAA	369-391 (X77858)
SEQ ID NO: 32	HPV 59 E6 Taq-Man Sonda	ACCGTTACATGAGCTGCTGATACG	342-365 (X77858)
SEQ ID NO: 33	HPV 59 E7 Cebador directo	GAAGTTGACCTTGTGTGCTAC	605-625 (X77858)
SEQ ID NO: 34	HPV 59 E7 Cebador inverso	ATTA ACTCCATCTGGTTCATCTT	660-682 (X77858)
SEQ ID NO: 35	HPV 59 E7 Taq-Man Sonda	ATTA ACTCCATCTGGTTCATCTT	631-654 (X77858)

5 Además de los cebadores y sondas, la PCR de Taq-Man requiere reactivos que se usan para PCR habituales (p.ej., polimerasa, nucleótidos libres) así como una máquina de PCR en tiempo real para analizar los datos. Los reactivos y el equipamiento son bien conocidos para los expertos en la técnica y no describen con detalle en la presente memoria.

10 Aunque la invención se ha descrito en la presente memoria con referencia a realizaciones particulares, debe entenderse que estas realizaciones son simplemente ilustrativas de los principios y aplicaciones de la invención descrita en la presente memoria. Por lo tanto, debe entenderse que se pueden hacer numerosas modificaciones de las realizaciones ilustrativas y que se pueden considerar otras disposiciones sin salirse de la invención definida por las reivindicaciones adjuntas.

**Listado de secuencias**

15 <110> BECTON DICKINSON

<120> Ensayo para detectar serotipos estrechamente relacionados del papilomavirus humano (HPV)

<130> BECTON 349/350

<140> pendiente

<141> pendiente

20 <150> US 61/304,941

<151> 2010-02-16

<160> 38

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

25 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador Sintético

	<400> 1 ccactagctg catgccaatc	20
5	<210> 2 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220> <223> Cebador Sintético	
10	<400> 2 ccattagctg catgccaatc	20
15	<210> 3 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220> <223> Cebador Sintético	
20	<400> 3 ctaattgtagt tgcatacacc ga	22
25	<210> 4 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220> <223> Cebador Sintético	
30	<400> 4 ctaattgtgt tgcatacacc ga	22
35	<210> 5 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220> <223> Sonda Sintética	
40	<400> 5 gagtaatatc gtagctcccg tatttt	26
45	<210> 6 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220> <223> Sonda Sintética	
50	<400> 6 gagtaatatc gtagtcccg tatttt	26
	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220> <223> Cebador Sintético	
50	<400> 7 tgtgccaagc attggagaca	20

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador Sintético  
 <400> 8  
 tgtgtcaggc gttggagaca 20  
 <210> 9  
 10 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador Sintético  
 15 <400> 9  
 caaatggatt tccctctcta ta 22  
 <210> 10  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador Sintético  
 <400> 10  
 caaatggatt tccatctcta ta 22  
 25 <210> 11  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 30 <223> Cebador Sintético  
 <400> 11  
 cctctctata tacaactgtt aaa 23  
 <210> 12  
 <211> 24  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador Sintético  
 <400> 12  
 40 ccatctctat acactattct taaa 24  
 <210> 13  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador Sintético  
 <400> 13  
 aaatggattt ccctctctat atac 24  
 <210> 14  
 50 <211> 24  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador Sintético  
 <400> 14  
 5 aaatggattt ccatctctat acac 24  
 <210> 15  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10 <220>  
 <223> Sonda Sintética  
 <400> 15  
 tcatatacct cagatcggtg caaag 25  
 <210> 16  
 15 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda Sintética  
 20 <400> 16  
 tcatatacct cagatcgctg caaag 25  
 <210> 17  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador Sintético  
 <400> 17  
 acctaataca cgtacctgt t 21  
 30 <210> 18  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 35 <223> Cebador Sintético  
 <400> 18  
 acctaattca cgtacctgt t 21  
 <210> 19  
 <211> 20  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador Sintético  
 <400> 19  
 45 acacgcaggt cctcttgg 20  
 <210> 20  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>

<223> Cebador Sintético  
 <400> 20  
 acacgtagct cctcttgggt      20  
 5 <210> 21  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda Sintética  
 10 <400> 21  
 tgtaagtttg tggcgcagtt ggaca      25  
 <210> 22  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda Sintética  
 <400> 22  
 tgtgagcttg tggcgcagtt ggaca      25  
 20 <210> 23  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda Sintética  
 <400> 23  
 tgtgagtttg tggcgcagtt ggaca      25  
 <210> 24  
 <211> 22  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador Sintético  
 <400> 24  
 35 gcagtatgca aacaatgttc ac      22  
 <210> 25  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <223> Cebador Sintético  
 <400> 25  
 tagtaattgc ctctaattgta gta      23  
 <210> 26  
 45 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda Sintética  
 50 <400> 26

	cctgctataa cgtctatact ctcta	25
	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Sintético	
	<400> 27	
	ctcagaggag gaggatgaag	20
10	<210> 28	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador Sintético	
	<400> 28	
	tgaacacctg caacacggag	20
	<210> 29	
	<211> 22	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda Sintética	
	<400> 29	
25	ctaccagaaa gacgggctgg ac	22
	<210> 30	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador Sintético	
	<400> 30	
	ggagaaacat tagaggctga a	21
	<210> 31	
35	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Sintético	
40	<400> 31	
	atagaggttt taggcatcta taa	23
	<210> 32	
	<211> 24	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda Sintética	
	<400> 32	
	accgttacat gagctgctga tacg	24
50	<210> 33	

# ES 2 665 465 T3

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

5 <220>  
 <223> Cebador Sintético

<400> 33  
 gaagttgacc ttgttgcta c 21

10 <210> 34  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador Sintético

15 <400> 34  
 attaactcca tctggtcat ctt 23

<210> 35  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Sonda Sintética

<400> 35  
 attacctgac tccgactccg agaa 24

25 <210> 36  
 <211> 91  
 <212> ADN  
 <213> Papilomavirus humano tipos 39 y 68

<400> 36  
 ccattagctg catgccaatc atgtattaa ttttatgcta aaatacggga actacgatat 60  
 tactcagaat cggtgtatgc aacaacatta g 91

30 <210> 37  
 <211> 138  
 <212> ADN  
 <213> Papilomavirus humano tipos 33 y 58

<400> 37  
 tgtgccaagc attggagaca actatacaca acattgaact acagtgcgtg gaatgcaaaa 60  
 agactttgca acgatctgag gtatatgatt ttgcatttgc agatttaaca gttgtatata 120

35 gagagggaaa tccatttg 138

<210> 38  
 <211> 79  
 <212> ADN  
 <213> Papilomavirus humano tipos 56 y 66

40 <400> 38  
 acctaataca cgtaccttgt tgtragtgta agtttgggt gcagttggac attcagagta 60  
 ccaaagagga cctgcgtgt 79

**REIVINDICACIONES**

1. Un ensayo múltiple para detectar la presencia o ausencia de múltiples serotipos de un organismo papilomavirus humano (HPV) en una muestra biológica, en donde el ensayo detecta más serotipos que canales hay para la detección, que comprende:

5 poner en contacto una muestra biológica con al menos tres conjuntos de cebadores/sondas, cada uno de los cuales comprende al menos una sonda de oligonucleótido que está marcada de forma detectable y tiene una secuencia de nucleótidos de longitud de 10 a 50 y al menos dos cebadores de oligonucleótidos cada uno de los cuales tiene una secuencia de unión a la diana que tiene una secuencia de nucleótidos de longitud de 10 a 25, en condiciones de modo que las sondas y cebadores se reasocian con una secuencia diana y en donde cada conjunto de  
10 cebadores/sondas es al menos preferiblemente para un serotipo específico de HPV, en donde el primer y segundo conjuntos de cebadores/sondas son degenerados uno respecto a otro y en donde las sondas degeneradas tienen cada una un resto señal que emite señal que es detectable en el mismo canal y en donde el tercer conjunto de cebadores/sondas no es degenerado con respecto a los otros dos conjuntos de cebadores/sondas y discrimina un tercer serotipo que no es los serotipos con los que se reasocian con preferencia los conjuntos de cebadores/sondas degenerados, en donde el tercer conjunto de cebadores/sondas tiene un resto señal que emite señal a una longitud de onda que es la misma o diferente de la longitud de onda emitida por el resto señal de las sondas degeneradas, y en donde la diana para los conjuntos de cebadores/sondas degenerados se selecciona del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 36-38;

amplificar, si está presente, la secuencia diana; y

20 vigilar la detección del marcador como una indicación de la hibridación del conjunto de sondas con la secuencia diana, que indica así la presencia o ausencia de al menos uno de los serotipos de HPV.

2. El ensayo de la reivindicación 1, en donde

(a) el conjunto de cebadores/sondas degenerado diana es de SEQ ID NO: 36, y en donde el tercer conjunto de cebadores/sondas está configurado para discriminar el HPV de serotipo 51 y no está degenerado con respecto al  
25 primer o segundo conjuntos de cebadores/sondas, en donde el tercer conjunto de cebadores/sondas se selecciona de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 24-29 y secuencias que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% complementarias con sus secuencias diana; el primer conjunto de cebadores/sondas selecciona el HPV de serotipo 39 y no discrimina el HPV de serotipo 39 con respecto al HPV de serotipo 68, en donde el primer conjunto de cebadores/sondas se selecciona de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 1, 3 y 5 y secuencias que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% complementarias con sus secuencias diana; y el segundo conjunto de cebadores/sondas selecciona el HPV de serotipo 68 y no discrimina el HPV de serotipo 68 con respecto al HPV de serotipo 39, en donde el segundo conjunto de cebadores/sondas se selecciona de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los  
30 SEQ ID NO: 2, 4 y 6, y secuencias que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% complementarias con sus secuencias diana; o

(b) en donde el conjunto de cebadores/sondas degenerado diana es el SEQ ID NO: 37 y en donde el tercer conjunto de cebadores/sondas está configurado para discriminar el HPV de serotipo 59 y no está degenerado con respecto al primer o segundo conjunto de cebadores/sondas, en donde el tercer conjunto de cebadores/sondas se selecciona de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 30-35 y secuencias que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% complementarias con sus secuencias diana; el primer conjunto de cebadores/sondas selecciona el HPV de serotipo 33 y no discrimina el HPV de serotipo 33 con respecto al HPV de serotipo 58, en donde el primer conjunto de cebadores/sondas se selecciona de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 y 15 y secuencias que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% complementarias con sus secuencias diana; y el segundo conjunto de cebadores/sondas selecciona el HPV de serotipo 58 y no discrimina el HPV de serotipo 58 con respecto al HPV de serotipo 33, en donde el segundo conjunto de cebadores/sondas se selecciona de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los  
40 SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14 y 16 y secuencias que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% complementarias con sus secuencias diana; o

(c) en donde el conjunto de cebadores/sondas degenerado diana es el SEQ ID NO: 38 y en donde el tercer conjunto de cebadores/sondas está configurado para discriminar el HPV de serotipo 59 y no está degenerado con respecto al primer o segundo conjunto de cebadores/sondas, en donde el tercer conjunto de cebadores/sondas se selecciona de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 30-35 y secuencias que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% complementarias con sus secuencias diana; el primer conjunto de cebadores/sondas selecciona el HPV de serotipo 56 y no discrimina el HPV de serotipo 66 con respecto al HPV de serotipo 56, en donde el primer conjunto de cebadores/sondas se selecciona de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 17, 19 y 21 y secuencias que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90%  
55

complementarias con sus secuencias diana; y el segundo conjunto de cebadores/sondas selecciona el HPV de serotipo 66 y no discrimina el HPV de serotipo 66 con respecto al HPV de serotipo 56, en donde el segundo conjunto de cebadores/sondas se selecciona de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 18, 20, 22 y 23 y secuencias que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% complementarias con sus secuencias diana.

3. Un conjunto de sondas para la detección de múltiples serotipos del papilomavirus humano (HPV) que comprende los al menos tres conjuntos de cebadores/sondas de oligonucleótidos de la reivindicación 1.

4. El conjunto de sondas de la reivindicación 3, en donde

(a) el conjunto de cebadores/sondas degenerado diana es el SEQ ID NO: 36, y en donde el tercer conjunto de cebadores/sondas está configurado para discriminar el HPV de serotipo 51 y no está degenerado con respecto al primer o segundo conjuntos de cebadores/sondas, en donde el tercer conjunto de cebadores/sondas se selecciona de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 24-29 y secuencias que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% complementarias con sus secuencias diana; el primer conjunto de cebadores/sondas selecciona el HPV de serotipo 39 y no discrimina el HPV de serotipo 39 con respecto al HPV de serotipo 68, en donde el primer conjunto de cebadores/sondas se selecciona de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 1, 3 y 5 y secuencias que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% complementarias con sus secuencias diana; y el segundo conjunto de cebadores/sondas selecciona el HPV de serotipo 68 y no discrimina el HPV de serotipo 68 con respecto al HPV de serotipo 39, en donde el segundo conjunto de cebadores/sondas se selecciona de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 2, 4 y 6, y secuencias que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% complementarias con sus secuencias diana; o

(b) en donde el conjunto de cebadores/sondas degenerado diana es el SEQ ID NO: 37 y en donde el tercer conjunto de cebadores/sondas está configurado para discriminar el HPV de serotipo 59 y no está degenerado con respecto al primer o segundo conjunto de cebadores/sondas, en donde el tercer conjunto de cebadores/sondas se selecciona de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 30-35 y secuencias que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% complementarias con sus secuencias diana; el primer conjunto de cebadores/sondas selecciona el HPV de serotipo 33 y no discrimina el HPV de serotipo 33 con respecto al HPV de serotipo 58, en donde el primer conjunto de cebadores/sondas se selecciona de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 y 15 y secuencias que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% complementarias con sus secuencias diana; y el tercer conjunto de cebadores/sondas selecciona el HPV de serotipo 58 y no discrimina el HPV de serotipo 58 con respecto al HPV de serotipo 33, en donde el segundo conjunto de cebadores/sondas se selecciona de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14 y 16 y secuencias que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% complementarias con sus secuencias diana; o

(c) en donde el conjunto de cebadores/sondas degenerado diana es el SEQ ID NO: 38 y en donde el tercer conjunto de cebadores/sondas está configurado para discriminar el HPV de serotipo 59 y no está degenerado con respecto al primer o segundo conjunto de cebadores/sondas, en donde el conjunto de cebadores/sondas se selecciona de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 30-35 y secuencias que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% complementarias con sus secuencias diana; el primer conjunto de cebadores/sondas selecciona el HPV de serotipo 56 y no discrimina el HPV de serotipo 66 con respecto al HPV de serotipo 56, en donde el primer conjunto de cebadores/sondas se selecciona de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 17, 19 y 21 y secuencias que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% complementarias con su secuencia diana; y el segundo conjunto de cebadores/sondas selecciona el HPV de serotipo 66 y no discrimina el HPV de serotipo 66 con respecto al HPV de serotipo 56, en donde el segundo conjunto de cebadores/sondas se selecciona de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 18, 20, 22 y 23 y secuencias que son al menos 70%, preferiblemente al menos 80% y más preferiblemente al menos 90% complementarias con sus secuencias diana.

5. Un kit para la detección de múltiples serotipos del papilomavirus humano (HPV), comprendiendo el kit al menos tres conjuntos de cebadores/sondas de oligonucleótidos como se expone en la reivindicación 1.

6. El kit de la reivindicación 5, en donde

(a) el conjunto de cebadores/sondas degenerado diana es el SEQ ID NO: 36 y el primer conjunto de cebadores/sondas degenerado comprende los SEQ ID NO: 1, 3 y 5, y el segundo conjunto de cebadores/sondas degenerado comprende los SEQ ID NO: 2, 4 y 6; o

(b) donde el conjunto de cebadores/sondas degenerado diana es el SEQ ID NO: 37 y el primer conjunto de cebadores/sondas degenerado comprende los SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15 y uno de los SEQ ID NO: 9, 11 y 13 y

el segundo conjunto de cebadores/sondas degenerado comprende los SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 15 y uno de los SEQ ID NO: 10, 12 y 14; o

(c) donde el conjunto de cebadores/sondas degenerado diana es el SEQ ID NO: 38 y el primer conjunto de cebadores/sondas degenerado comprende los SEQ ID NO: 17, 19 y 21 y el segundo conjunto de cebadores/sondas degenerado comprende los SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y uno de los SEQ ID NO: 22 y 23.

- 5
7. El kit de la reivindicación 5, en donde el tercer conjunto de cebadores/sondas se selecciona del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 24-26, SEQ ID NO: 27-29, SEQ ID NO: 30-32 y SEQ ID NO: 33-35.
8. El kit de la reivindicación 5, en donde el tercer conjunto de cebadores y sondas discrimina el HPV de serotipo 51 y se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24-26 y SEQ ID NO: 27-29.
- 10
9. El kit de la reivindicación 5, en donde el tercer conjunto de cebadores y sondas discrimina el HPV de serotipo 59 y se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 30-32 y SEQ ID NO: 33-35.
10. El kit de la reivindicación 5, en donde el resto señal de la sonda detectora del tercer conjunto de cebadores/sondas emite a una longitud de onda que es la misma que la longitud de onda emitida por la sonda detectora del primer y segundo conjuntos de cebadores/sondas.
- 15
11. El kit de la reivindicación 5, en donde el resto señal de la sonda detectora del tercer conjunto de cebadores/sondas emite a una longitud de onda que es diferente de la longitud de onda emitida por la sonda detectora del primer y segundo conjuntos de cebadores/sondas.



FIG. 2A qPCR Diseño de cebadores/sondas degenerado para detectar HPV de tipos 33 y 58; ADN del gen E6

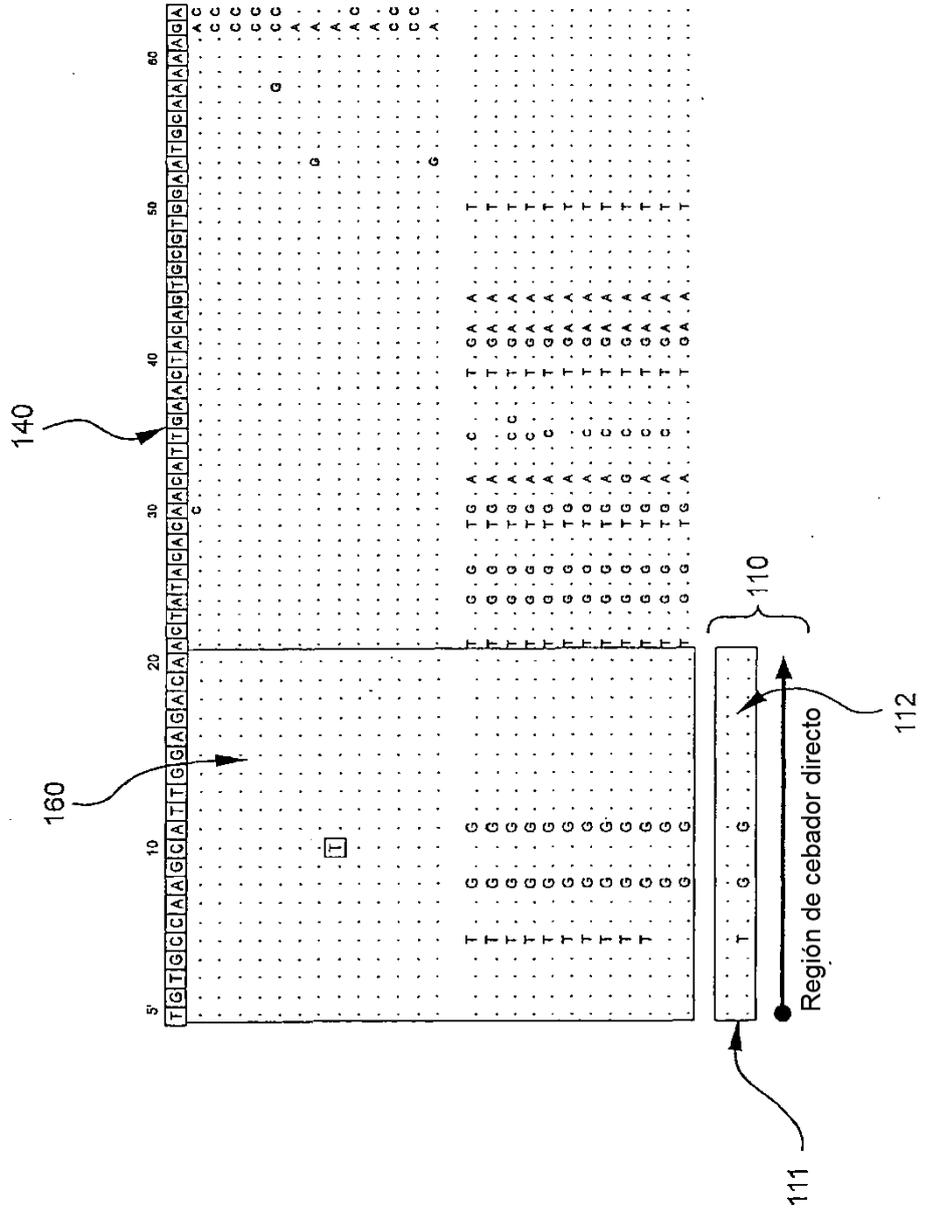




FIG. 3 qPCR Conjunto de cebadores/sondas degenerado para detectar HPV de tipos 56 y 66; ADN del gen E7

