

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 746**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.04.2015 PCT/PL2015/050007**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2015 WO15156693**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2015 E 15722601 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 3129512**

54 Título: **Prueba de cribado para detectar la presencia de virus VPH oncogénicos**

30 Prioridad:

11.04.2014 PL 40786414

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

04.10.2018

73 Titular/es:

**CENTRUM ONKOLOGII - INSTYTUT IM. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE (50.0%)
ul. Wawelska 15B
02-034 Warszawa, PL y
CERVICO SP. Z O.O. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WYRWICZ, LUCJAN y
PODOLSKI, JACEK**

74 Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

ES 2 684 746 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

Prueba de cribado para detectar la presencia de virus VPH oncogénicos

Campo técnico

5 **[0001]** La invención se refiere al campo del diagnóstico de cáncer cervical, y en concreto a una prueba de cribado para virus VPH oncogénicos, preferiblemente basada en tecnología ANB (ácido nucleico bloqueado) y un proceso asociado, como una nueva herramienta para la prevención y la detección temprana de cáncer cervical.

Antecedentes de la técnica

10 **[0002]** El cáncer cervical es un tumor maligno, que todavía supone un problema de salud y social importante a nivel mundial. Cada año se diagnostican aproximadamente 500.000 nuevos casos de esta enfermedad en el mundo, y más de la mitad de las mujeres diagnosticadas mueren a causa de la enfermedad. Aunque todas las mujeres son vulnerables a este tipo de cáncer, se han observado diferencias geográficas significativas de incidencia y mortalidad.

15 **[0003]** Casi el 80 % de los casos de cáncer cervical se diagnostican en países en desarrollo, en los que esta enfermedad se puede incluso situar primera como la principal causa de muerte entre las mujeres en comparación con otros cánceres genitales. En estos países, se espera un incremento del número de casos en los próximos años. La tendencia descendente de la incidencia del cáncer cervical y una tasa de mortalidad inferior en los países desarrollados se relacionan con la introducción de prevención de carácter general y sistemático y un mejor acceso a la atención médica moderna.

20 **[0004]** Polonia pertenece a ese grupo de países con una incidencia y una tasa de mortalidad del cáncer cervical relativamente elevadas. Es el segundo tumor maligno más común en las mujeres de más de 45 años de edad. Cada año, se diagnostica cáncer cervical en aproximadamente 3500 mujeres polacas, y la mitad de ellas fallece a causa de este. El número de muertes a causa de este tipo de cáncer sitúa a Polonia en una de las primeras posiciones a nivel europeo.

25 **[0005]** El tratamiento del cáncer cervical depende de la fase de la enfermedad, y comprende una escisión local y cirugía radical en etapas tempranas de la enfermedad, radioterapia radical combinada con braquiterapia y quimioterapia simultánea en etapas avanzadas, y cuidados paliativos en caso de enfermedad metastásica. Dentro de los tratamientos con quimioterapia, los que se utilizan más habitualmente son el carboplatino y el paclitaxel. Se puede aumentar el tiempo de supervivencia de pacientes en casos avanzados con medicamentos adicionales. Informes recientes sugieren la posibilidad de la aplicación adicional de terapia dirigida (bevacizumab) para esta
30 indicación, la cual mejora los parámetros de esperanza de vida en los cuidados paliativos; sin embargo, afecta significativamente al coste de dicho tratamiento. En caso de presentar resistencia al platino, el segundo medicamento de preferencia es el topotecán.

35 **[0006]** En 2006, se lanzaron al mercado vacunas que tenían como objetivo prevenir infecciones por VPH, la principal causa de incidencia de cáncer cervical, Una vacuna denominada Gardasil ha sido aprobada para su uso en los Estados Unidos y en la Unión Europea. Otra vacuna contra infecciones por VPH es Cervarix.

40 **[0007]** El cáncer cervical es uno de las pocas neoplasias malignas, que, no obstante, puede prevenirse eficazmente con profilaxis adecuada y diagnóstico temprano de afecciones médicas que predisponen a su desarrollo (esto es, lesiones precancerosas, conocidas como neoplasia intraepitelial). Los exámenes citológicos de frotis cervicales con el objetivo de detectar células anormales del epitelio escamoso estratificado o glandular llevados a cabo con regularidad en mujeres han sido, hasta la fecha, el método básico y más efectivo para dicha profilaxis. A pesar del indudable valor que presenta el examen citológico en un cribado basado en la población para el cáncer cervical, la limitación fundamental de este método es su relativamente baja sensibilidad, de aproximadamente un 60 %. De acuerdo con muchos estudios científicos, una combinación de exámenes citológicos y de genética molecular para los llamados tipos oncogénicos del virus del papiloma humano (VPH), un grupo de 15 de 100 tipos conocidos de
45 VPH, los cuales provocan de forma directa el proceso de carcinogénesis en el epitelio del cuello uterino en algunas de las mujeres infectadas (también conocidos como virus de alto riesgo, VPH de alto riesgo, HR-VPH), resulta mucho más efectivo a la hora de detectar lesiones precancerosas avanzadas (denominadas CIN2, CIN3, carcinoma *in situ*). Además de la alta sensibilidad que presenta un examen combinado citológico y de VPH (hasta un 100 %), y con únicamente una especificidad inferior comparada con solo el examen citológico, el método
50 también se caracteriza por un elevado índice denominado NPV (valor predictivo negativo, por sus siglas en inglés). Dichos exámenes combinados se recomiendan especialmente para mujeres que superen los 30 años de edad. Además del uso de pruebas de VPH en el cribado primario para el cáncer cervical, como complemento al diagnóstico citológico, también se recomienda la determinación de infecciones virales provocados por el grupo de VPH oncogénico en la denominada fase de diagnóstico ampliado en mujeres en las que se ha detectado una
55 presencia de células epiteliales anormales, especialmente en el caso de los diagnósticos conocidos como ASC-US y LSIL (recomendaciones de la Sociedad Ginecológica Polaca y de instituciones internacionales). La realización de la prueba de presencia de tipos oncogénicos de VPH en mujeres con ciertas anomalías en una preparación citológica permite un diagnóstico posterior y un posible tratamiento más específicos.

[0008] Por consiguiente, parece razonable el uso común de pruebas de genética molecular para detectar tipos de VPH oncogénicos, como complemento a programas de cribado basado en la población en función de exámenes citológicos de frotis cervicales. Desgraciadamente, debido a motivos técnicos (elevada complejidad de las pruebas, en las que se analizan varias docenas de tipos de VPH con una baja homología de genoma en un único ensayo) y el coste de las pruebas de VPH disponibles en el mercado, no son comunes dichos exámenes preventivos combinados dentro de los programas de cribado basado en la población, tanto en Polonia como en el resto del mundo, y se limitan exclusivamente a la fase de diagnóstico ampliado en el caso de detectar células anormales en pruebas de cribado citológico. Otro problema es la falta de un estándar metodológico uniforme para las pruebas de VPH.

[0009] El método de captura de híbridos (Digene) se considera el método de referencia para el diagnóstico de VPH. Sin embargo, este método presenta una sensibilidad de diagnóstico relativamente baja. Además, la prueba permite detectar únicamente algunos de los tipos de VPH oncogénicos conocidos. La mayoría de las pruebas disponibles en el mercado para el diagnóstico de VPH se basan en métodos de genotipado (determinación de tipos de VPH individuales), los cuales generan un elevado coste, así como análisis que requieren mucho tiempo y esfuerzo y una reducción de la especificidad del método para la detección de anomalías morfológicas del cuello uterino. En los últimos años, han aparecido en el mercado unas cuantas pruebas aprobadas para uso clínico (certificadas CE-JVD) basadas en distintos métodos de genética molecular, empleando técnicas de amplificación del ADN (p. ej., PCR) para detectar infecciones por VPH del grupo caracterizado por un alto riesgo de desarrollo de cáncer cervical (sin distinción de tipo). No obstante, por lo general, estas no comprenden un análisis de la totalidad de los tipos de VPH oncogénicos, y su elevado precio impide su uso extendido en pruebas de cribado basado en la población de cáncer cervical en Polonia.

[0010] Actualmente, el método de PCR en tiempo real (PCR en tiempo real) se utiliza ampliamente en diagnósticos virales, pero requiere un enfoque individual para cada microorganismo investigado. Para utilizar este método para el diagnóstico, es necesario seleccionar de forma adecuada secuencias, denominadas cebadores y sondas moleculares, así como las condiciones de reacción, con el fin de asegurar la más elevada credibilidad clínica de la prueba y, en concreto, un umbral adecuado de detección de patógenos y una adecuada especificidad diagnóstica. Preferiblemente, la reacción multiplex permite diagnosticar en una única etapa varios tipos de VPH, lo cual es, no obstante, una tarea extremadamente complicada y requiere la obtención de una prueba caracterizada por una alta sensibilidad y especificidad de detección.

[0011] Los ensayos de PCR en tiempo real en virología han sido revisados por Mackay *et al.*, 2002, Nucleic Acid Research, 30(6), 1292-1305. En el documento WO08/145366(Univ. Milano Bicocca) se ha descrito un método de identificación y cuantificación de ácidos nucleicos de VPH oncogénico. El método utilizaba 5 ensayos independientes de PCR en tiempo real como un cribado de primera línea para identificar la presencia de VPH en la muestra, y después se llevaron a cabo ensayos de PCR en tiempo real TaqMan en muestras positivas para determinar la presencia y la carga viral de los tipos más comunes de VPH oncogénico. En cuanto a la PCR cuantitativa en tiempo real: Methods and Protocols, Chapter 8 in Methods in Molecular Biology, vol. 1160:87-97 2014, Broccolo describió una plataforma de PCR en tiempo real multiplex integrada en un método automático de extracción para la rápida detección y medición de la carga de ADN de VPH oncogénicos a partir de muestras cervicales. En este sistema, se realizaron dos ensayos de qPCR multiplex (cribado de primera línea) para detectar y cuantificar VPH-16, -18, -31, -33, -45, -52, y -58 (VPH-18 y -45 se midieron juntos mediante un único fluorocromo. Además, se utilizó un ensayo de qPCR multiplex específico para VPH-18 y VPH-45 para determinar de forma precisa si las muestras encontradas resultaron positivas para una de las dos cepas. Micalessi *et al.* describió un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real basado en TaqMan para una detección de alto rendimiento de 17 genotipos de VPH en siete reacciones multiplex, y presentó una sensibilidad analítica de <100 copias (Clin. Chem. Lab. Med., 50(4):655-661 2011).

[0012] Existe una gran demanda para llevar a cabo una prueba para observar la presencia de tipos de VPH oncogénicos con el fin de aplicar el diagnóstico y procedimiento terapéutico apropiados. Definitivamente, el número de pruebas de VPH realizadas es no es suficiente debido a sus elevados costes y a su disponibilidad comercial limitada. El desarrollo de una prueba de bajo coste y clínicamente fiable para detectar la presencia de tipos de VPH oncogénicos aumentará de forma significativa la disponibilidad de diagnósticos modernos de afecciones médicas que predisponen al cáncer cervical. Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es desarrollar una prueba de diagnóstico que permitiría una detección sensible, específica y poco costosa de tipos de VPH oncogénicos en un frotis cervical recogido en el medio líquido (citología de base líquida - LBC, por sus siglas en inglés).

Descripción de la invención

[0013] La invención da a conocer un método para determinar si una muestra resulta positiva en virus del papiloma humano (VPH) oncogénico, comprendiendo el método:

combinar la muestra con cebadores para una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real que amplifique una región objetivo de genomas de VPH oncogénicos, y una sonda marcada pan-VPH capaz de emitir una señal al amplificar la región objetivo, que proporciona condiciones para la PCR en tiempo real, y medir una señal emitida desde la sonda marcada pan-VPH, donde la detección de la señal indica que la muestra ha resultado positiva en VPH oncogénico,

caracterizado por que la sonda pan-VPH es una molécula de ácido nucleico bloqueado marcada (LNA, por sus siglas en inglés) que comprende la secuencia ACTTTCGTTT (SEQ ID N.º 25) o el complemento inverso de esta.

5 **[0014]** Preferiblemente, la sonda pan-VPH es una molécula marcada con 10 nucleótidos de la secuencia que consiste en ACTTTCGTTT (SEQ ID N.º 25) o el complemento inverso de esta y/o la sonda pan-VPH está marcada en su extremo 5' con un fluorocromo y en su extremo 3' con un extintor, y donde la señal emitida tras la amplificación de la región objetivo es fluorescente.

10 **[0015]** Preferiblemente, los cebadores se emplean para la amplificación de una región objetivo de cualquiera de entre VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 o VPH68 y/o que comprende combinar la muestra con una combinación de cebadores para la amplificación de una región objetivo de la totalidad de VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 o VPH68.

[0016] Los cebadores pueden comprender uno o más de los siguientes pares de cebadores:

- a) para VPH16, SEQ ID N.º: 1 y SEQ ID N.º 14
- 15 b) para VPH18, SEQ ID N.º: 2 y SEQ ID N.º 15
- c) para VPH33/33n, SEQ ID N.º: 3 y SEQ ID N.º 14
- d) para VPH31, SEQ ID N.º: 4 y SEQ ID N.º 14
- e) para VPH35, SEQ ID N.º: 5 y SEQ ID N.º 14
- f) para VPH39, SEQ ID N.º: 6 y SEQ ID N.º 14
- 20 g) para VPH45, SEQ ID N.º: 7 y SEQ ID N.º 15
- h) para VPH51, SEQ ID N.º: 8 y SEQ ID N.º 16
- i) para VPH52, SEQ ID N.º: 9 y SEQ ID N.º 14
- j) para VPH56/66, SEQ ID N.º: 10 y SEQ ID N.º 14
- k) para VPH58, SEQ ID N.º: 11 y SEQ ID N.º 14
- 25 l) para VPH59, SEQ ID N.º: 12 y SEQ ID N.º 17
- m) para VPH68, SEQ ID N.º: 13 y SEQ ID N.º 18

y/o donde los cebadores comprenden la totalidad de los pares de cebadores (a) a (m).

30 **[0017]** Un método de acuerdo con la invención puede comprender combinar la muestra con cebadores para la amplificación de una región objetivo de VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 y VPH68, detectar una señal de la sonda marcada de pan-VPH, y

concluir que las muestras dan resultado positivo en VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 or VPH68.

35 **[0018]** Un método de acuerdo con la invención puede comprender combinar la muestra con cebadores para la amplificación de una región objetivo de VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 y VPH68, no detectar ninguna señal de la sonda marcada de pan-VPH, y

concluir que las muestras dan resultado negativo en VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 VPH68.

[0019] Un método de acuerdo con la invención puede comprender además

40 combinar la muestra con cebadores para la amplificación de una región objetivo de VPH33n, y una sonda marcada de 33n capaz de emitir una señal tras la amplificación de la región objetivo, donde la sonda de 33n y la sonda pan-VPH llevan la misma marca, proporcionando condiciones para la PCR en tiempo real, y

medir una señal emitida desde la sonda marcada de 33n y/o la sonda de pan-VPH,

donde la detección de la señal indica que la muestra da un resultado positivo en VPH oncogénico.

45 caracterizado por que la sonda de 33n es una molécula de ácido nucleico bloqueado marcada (LNA, por sus siglas en inglés) que comprende la secuencia ACTTTCGCTT (SEQ ID N.º 26) o el complemento inverso de esta.

[0020] En tales métodos, la sonda de 33n puede ser una molécula marcada con 10 nucleótidos de la secuencia que consiste en ACTTTCGCTT (SEQ ID N.º 26) o el complemento inverso de esta y/o la sonda de 33n es una

molécula marcada con 10 nucleótidos de la secuencia que consiste en ACTTTCGCTT (SEQ ID N.º 26), o el complemento inverso de esta.

[0021] Un método de acuerdo con la invención puede comprender determinar si las muestras dan positivo en VPH16 o VPH18, comprendiendo el método

- 5 combinar la muestra con cebadores para la amplificación con PCR en tiempo real de una región objetivo de los genomas de VPH16 y VPH18, y una sonda marcada de 16/18 capaz de emitir una señal tras la amplificación de la región objetivo,
- proporcionar condiciones para la PCR en tiempo real, y medir una señal de la sonda marcada de 16/18,
- donde la detección de una señal indica que la muestra da un resultado positivo en VPH16 o VPH18,
- 10 caracterizado por que la sonda de 16/18 es una molécula de ácido nucleico bloqueado marcada (LNA) que comprende la secuencia ATATCWGATGACGAG (SEQ ID N.º 27) o el complemento inverso de esta. La sonda de 16/18 puede ser una molécula marcada con 15 nucleótidos de la secuencia que consiste en ATATCWGATGACGAG (SEQ ID N.º 27) o el complemento inverso de esta.

[0022] La sonda de 16/18 puede llevar una marca distinta de la sonda de pan-VPH.

- 15 **[0023]** La sonda de 16/18 puede estar marcada en su extremo 5' con un fluorocromo y en su extremo 3' con un extintor, y donde la señal emitida tras la amplificación de la región objetivo es fluorescente.

[0024] La sonda de 16/18 puede emitir una señal fluorescente con una longitud de onda distinta de la de la sonda de pan-VPH.

- 20 **[0025]** Los cebadores para su uso en un método de acuerdo con la invención para determinar si la muestra da resultado positivo en VPH16 o VPH18 pueden comprender uno o ambos de los siguientes pares de cebadores:

- a) para VPH16, SEQ ID N.º: 19 y la SEQ ID N.º 20.
- b) para VPH18, SEQ ID N.º: 21 y SEQ ID N.º: 22

- 25 **[0026]** Un método de acuerdo con la invención puede comprender además realizar un control positivo para la PCR en tiempo real, comprendiendo combinar la muestra con cebadores para la amplificación con PCR en tiempo real de una secuencia de ADN control, preferiblemente ADN humano presente en la muestra, con una sonda control marcada capaz de emitir una señal tras la amplificación de la secuencia de ADN control, preferiblemente ADN humano

proporcionar condiciones para la PCR en tiempo real, y medir una señal de la sonda control,

donde la detección de la señal indica que la PCR en tiempo real es funcional.

- 30 **[0027]** En un método de acuerdo con la invención, la muestra puede ser una muestra de citología de base líquida de un frotis cervical humano.

- 35 **[0028]** La invención da a conocer además una composición que comprende una sonda marcada de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos ACTTTCGTTT (SEQ ID N.º: 25) o el complemento inverso de esta, y una marca detectable. La sonda puede comprender nucleótidos LNA. Preferiblemente, la sonda es una molécula con 10 nucleótidos de la secuencia que consiste en ACTTTCGTTT (SEQ ID N.º 25) o el complemento inverso de esta, marcada con un fluorocromo y un extintor. La sonda puede estar marcada en su extremo 5' con un fluorocromo y en su extremo 3' con un extintor.

[0029] La invención da a conocer además el uso de una composición de acuerdo con la invención al realizar la PCR en tiempo real para la detección de VPH.

- 40 **[0030]** Sorprendentemente, los inventores cumplieron el objetivo expuesto anteriormente de obtener una prueba de diagnóstico para la presencia de VPH oncogénicos, caracterizada por muchas ventajas, como la facilidad de aplicación, el bajo coste, los parámetros favorables: alta sensibilidad, eficacia clínica, especificidad, y un umbral de detección deseado clínicamente para el VPH16/18 y otros tipos de VPH oncogénicos. Además, como se demuestra más adelante, esta prueba puede potencialmente permitir la renuncia a un examen citológico en una población grande de mujeres HR-VPH negativas.
- 45

- 50 **[0031]** El genoma del VPH posee aproximadamente 8 mil nucleótidos, y la longitud de las secuencias continuas con homología completa entre los tipos oncogénicos no supera las varias docenas de pares de bases. Dicha elevada diversidad entre los VPH no permite diseñar una cantidad mínima de sondas de hibridación, lo cual permitiría detectar todos los virus VPH oncogénicos en una reacción. Este problema se puede solventar utilizando nucleótidos LNA (ácidos nucleicos bloqueados) modificados en una sonda molecular. Los nucleótidos LNA contienen un puente de metileno adicional en la molécula de desoxirribosa, lo cual, a causa del cambio en la conformación y a la rigidez de la molécula, aumenta el punto de fusión de los oligómeros construidos a partir de dichos nucleótidos y la estabilidad de los enlaces entre nucleótidos complementarios en el proceso de hibridación. Las propiedades de los LNA han sido revisadas por Vester & Wengel, Biochemistry 43(42): 13233-13241 2004. De

acuerdo con la invención, gracias al uso de los LNA, es posible aplicar ventajosamente sondas moleculares de tipo TaqMan significativamente más cortas, en comparación con las tradicionales, con una elevada especificidad de hibridación en el producto de amplificación en PCR con una temperatura óptima para la reacción en una PCR. El uso de sondas TaqMan de LNA significativamente más cortas, con 8-10 nucleótidos (en comparación con los 20-30 nucleótidos de las sondas convencionales), permite un encaje más fácil en regiones homólogas cortas (de hasta 10-12 pares de bases) entre tipos de VPH oncogénicos distintos y, por consiguiente, permite el desarrollo de una nueva prueba de diagnóstico.

[0032] Existe una gran demanda de pruebas que utilicen tecnología de LNA, lo cual permitiría obtener experiencia relevante desde el punto de vista clínico en el campo de la prevención y el diagnóstico de cáncer cervical. Las pacientes también desean someterse a exámenes preventivos modernos que sean altamente sensibles y económicamente accesibles.

[0033] Por consiguiente, se desarrolló una prueba denominada HR-VPH, preferiblemente basada en una técnica de PCR multiplex en tiempo real (PCR multiplex en tiempo real), llevada a cabo en un único tubo de ensayo sellado, utilizando sondas moleculares de tipo TaqMan diseñadas especialmente con métodos bioinformáticos. Las sondas emplearon tecnología innovadora de LNA, la cual no había sido utilizada previamente en las pruebas para la presencia de VPH.

[0034] Preferiblemente, la reducción de la longitud de las sondas a 8-10 nucleótidos permitió un descenso significativo de su número, de 15-16 a solo unos cuantos (de forma óptima, 2-3). Preferiblemente, también permitió llevar a cabo una reacción de PCR multiplex en tiempo real en un único tubo de ensayo, a diferencia de la mayoría de las pruebas presentes en el mercado, las cuales se llevan a cabo en varios tubos de ensayo. En una forma de realización de la invención, las sondas de LNA se marcaron de forma óptima con 3 tintes fluorescentes universales distintos como máximo con diferentes espectros de emisión de luz fluorescente, lo cual permite realizar las pruebas en la mayoría de aparatos de PCR disponibles comercialmente, y no solo en dispositivos diseñados para la prueba de un fabricante concreto.

[0035] Para aplicar la invención, se diseñó y se adaptó un kit de cebadores y sondas que permitían la identificación y amplificación de regiones homólogas en todos los tipos de VPH oncogénicos y, preferiblemente, un control interno, siendo una secuencia seleccionada de ADN humano y/o un fragmento de ADN sintético. En una forma de realización, preferiblemente, la reacción se realizó en un único tubo de ensayo, y preferiblemente, la lectura de la reacción se llevó a cabo en 4 canales de detección como máximo utilizados en la mayoría de aparatos de PCR en tiempo real presentes en el mercado.

[0036] Se diseñaron dos sondas TaqMan LNA de 10 nucleótidos que permitían detectar infecciones de VPH de alto riesgo (HR-VPH) en una reacción de PCR en tiempo real. La primera de ellas, HRP (pan-VPH), es complementaria de todos los virus VPH oncogénicos, mientras que la segunda, HRP33n, es complementaria a la variante identificada de VPH33n, que comprende polimorfismo de un nucleótido A/G en el sitio en el que se añade la sonda. Preferiblemente, los extremos 5' de las sondas de pan-VPH y HRP33n se marcaron con un tinte fluorescente FAM (fluoresceína), mientras que los extremos 3' se marcaron con un extintor BHQ1 (Black Hole Quencher 1).

[0037] La lectura de una PCR en tiempo real para las sondas HRP de pan-VPH y HRP33n se realizó con una longitud de onda de 530 nm en un canal diseñado para leer tinte FAM.

[0038] Asimismo, preferiblemente, se diseñó un control interno para el ensayo de PCR. Se utilizó un sistema que consistía en un fragmento corto de ADN sintético y se diseñó como objetivo un oligonucleótido que comprendía 77 pares de bases. Se diseñó un sistema de 4 cebadores y una sonda TaqMan de LNA (ICP) con 10 nucleótidos para la amplificación y detección del control interno sintético. Se seleccionó una combinación óptima de 2 cebadores para la PCR. La sonda ICP se marcó con tinte ROX en su extremo 5', y con un extintor BHQ2 en su extremo 3'. La lectura de la PCR en tiempo real para la sonda ICP se realizó con una longitud de onda de 610 nm (canal del tinte ROX).

[0039] El objetivo del estudio era posiblemente diseñar un pequeño kit de cebadores que permitiera la amplificación eficaz de todos los tipos de VPH oncogénicos en muestras clínicas con la suficiente sensibilidad y especificidad, con una posible eliminación completa de cualquier efecto adverso que pueda ocurrir durante la PCR, preferiblemente llevada a cabo en tiempo real, preferiblemente en varios canales de detección.

[0040] Como resultado de la investigación llevada a cabo, se desarrolló una agrupación de cebadores para el VPH de alto riesgo. Las secuencias se seleccionaron de tal forma que el número total de cebadores era lo más pequeño posible. Por lo tanto, algunas secuencias de cebadores son comunes para varios tipos de VPH. Así, se seleccionó el cebador inverso común («inverso») para los tipos de VPH 16, 31, 33, 33n, 35, 39, 52, 56, 58 y el cebador inverso común («inverso») para los tipos de VPH 18 y 45. Asimismo, se seleccionaron los cebadores directos comunes para los tipos 56 y 66 y para los tipos 33 y 33n, respectivamente.

[0041] De acuerdo con la forma de realización de la invención, preferiblemente, la mezcla final del ensayo HR-VPH de la invención comprende 18 cebadores (13 cebadores directos y 5 cebadores inversos) y 2 sondas LNA-

TaqMan para la detección de 15 tipos de VPH oncogénicos, 2 cebadores y 1 sonda TaqMan para el control interno sintético.

5 **[0042]** Mediante el uso de muestras clínicas seleccionadas, examinadas previamente con la conocida prueba PapilloCheck, la cual detecta 24 tipos de VPH (aproximadamente 50 muestras clínicas que contenían el ADN de un único tipo de VPH oncogénico, 30 muestras clínicas que contenían el ADN de un tipo de VPH no oncogénico, 50 muestras clínicas que contenían coinfecciones y 30 muestras negativas (libres de los 24 tipos de VPH, incluidos todos los tipos oncogénicos), se demostró que una combinación adecuada de cebadores y sondas moleculares, de acuerdo con la invención, permite la detección específica de tipos de VPH oncogénicos (incluida la variante VPH33n) y produce resultados negativos en el caso de muestras clínicas que contienen un tipo de virus no oncogénico y muestras clínicas negativas. Además, la reacción que utilizaba los 24 cebadores mencionados anteriormente, 3 sondas LNA y una sonda TaqMan de control interno (IC) no generó productos del tipo cebador-dímero ni otro producto de amplificación en PCR no específico.

Descripción de los dibujos

15 **[0043]** En el dibujo se ha mostrado una forma de realización del objeto de la invención, en el cual la figura 1 presenta los resultados obtenidos en un ejemplo de prueba utilizando una PCR en tiempo real para todos los grupos de VPH oncogénicos, con una muestra control positiva, una muestra control negativa y una muestra clínica negativa. Se utilizó un canal de detección de 530 nm.

20 La figura 2 muestra los resultados obtenidos en un ejemplo de forma de realización de una prueba utilizando una PCR en tiempo real para los tipos de VPH 16 y 18, con una muestra control positiva, una muestra control negativa y una muestra clínica negativa. Se utilizó un canal de detección de 560 nm.

La figura 3 muestra los resultados obtenidos en un ejemplo de forma de realización de una prueba utilizando una PCR en tiempo real para el control interno (IC) de la prueba, con una muestra control positiva, una muestra control negativa y una muestra clínica negativa. Se utilizó un canal de detección de 610 nm.

25 Las figuras 4A - D muestran secuencias de ejemplos de sondas y cebadores de acuerdo con varias formas de realización de la invención, y las regiones correspondientes del genoma del VPH en las que se hibridan.

30 La figura 4A muestra una región del gen E1 del VPH16 (SEQ ID N.º 33) que se amplifica y es objetivo de la sonda HR-VPH (pan-VPH) (SEQ ID N.º 25) para la detección de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 66, 58, 59 y 68; mostrándose en negrita y subrayada la secuencia objetivo con la que hibrida la sonda (SEQ ID N.º 34). También se muestra la secuencia de la sonda HR-VPH (pan-VPH) (5'-acttctgtt-3', SEQ ID N.º 25 / 29), que es el complemento inverso de la secuencia objetivo.

La figura 4B muestra una región del gen E1 del VPH33n (SEQ ID N.º 34), que se amplifica y es objetivo de la sonda VPH 33n para la detección de VPH33n; mostrándose en negrita y subrayada la secuencia objetivo (SEQ ID N.º 36) con la que hibrida la sonda. También se muestra la secuencia de la sonda HR-VPH 33n (5'-acttctgctt-3', SEQ ID N.º 26 / 30), que es el complemento inverso de la secuencia objetivo.

35 La figura 4C muestra las regiones del gen E1 del VPH16 (SEQ ID N.º 37) y del gen E1 del VPH18 (SEQ ID N.º 40) que se amplifican por ser objetivo de la sonda VPH 16/18. La secuencia objetivo con la que hibridan el cebador VPH 16 F HEX (SEQ ID N.º 19) y el cebador VPH 16 R HEX (SEQ ID N.º 20) para la amplificación y la secuencia objetivo (SEQ ID N.º 71) con la que hibrida la sonda VPH 16/18 (SEQ ID N.º 38) se muestran en negrita y subrayadas. Las secuencias objetivo con las que hibridan el cebador VPH 18 F HEX (SEQ ID N.º 19) y el cebador VPH 18 HEX (SEQ ID N.º 22) para la amplificación y la secuencia objetivo con la que hibrida la sonda VPH 16/18 (SEQ ID N.º 39) se muestran en negrita y subrayadas. Nótese que la sonda VPH 16/18 mostrada (5'-atatctgatgacgag-3' (SEQ ID N.º 39) presenta un nucleótido «t» marcado, mientras que la SEQ ID N.º 38 de la sonda VPH 16/18 presenta un residuo «a» en esta posición. El cebador inverso VPH 18 R HEX presenta un nucleótido «a» donde se indica, mientras que para la secuencia objetivo mostrada el complemento sería normalmente un nucleótido «g», la secuencia de VPH nativa presenta un nucleótido «t» en esta posición, por lo que el cebador inverso utilizada para dirigirse a esta secuencia presenta una «a» en esta posición.

40 La figura 4D muestra también la región del gen E1 del VPH16 (SEQ ID N.º 41) que se amplifica y es objetivo de la sonda HR-VPH (pan-VPH) para la detección de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 66, 58, 59 y 68. La secuencia objetivo con la que hibridan los cebadores VPH 16 F (SEQ ID N.º 1) y VPH 16 / 31/ 33 / 33n / 35 / 39 / 52 / 56 / 58 / 66 R (SEQ ID N.º 14) se muestran en negrita y subrayadas. La secuencia objetivo (SEQ ID N.º 34) con la que hibrida la sonda pan-VPH (SEQ ID N.º 25) se muestra en negrita y subrayada.

55 Las figuras 5A - M muestran secuencias de las regiones E1 del genoma del VPH de alto riesgo en las cepas de VPH 16, 18, 33, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 con las secuencias de las sondas y cebadores de acuerdo con varias formas de realización de la invención, y las regiones correspondientes del genoma del VPH con las que hibridan para la detección en el primer canal de detección FAM 530 nm. La figura 5A muestra los nucleótidos 865 a 2814 del gen E1 del VPH 16 (SEQ ID N.º 44), marcados para mostrar las posiciones del cebador directo del VPH 16 (SEQ ID N.º 1) 5'-gcacaggaagcaaacacatag-3' y la región del gen E1 del VPH 16 que es objetivo del cebador inverso de VPH 16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R 5'-agacagcgggtatggcaatac-3'

(SEQ ID N.º 45). También se muestra el cebador inverso de VPH 16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R 5'-gtattgccataccgctgtct-3' (SEQ ID N.º 14), que es el complemento inverso de la región del gen EI del VPH 16 mostrado en la SEQ ID N.º 45. La secuencia 5'-aaacgaaagt-3' es la secuencia objetivo de la sonda pan-VPH (SEQ ID N.º 34) para la hibridación de la sonda pan-VPH 5'-actttcgttt-3' (SEQ ID N.º 25), que es el complemento inverso de la SEQ ID N.º 34). La región objetivo de VPH16 amplificada para la detección con la sonda pan-VPH son los nucleótidos 1081 a 1274.

La figura 5B muestra la secuencia de nucleótidos 914 a 2887 del gen EI del VPH 18 (SEQ ID N.º 46), marcada para mostrar las posiciones del cebador directo del VPH 18 5'-aggccacaatgatgcacaag-3' (SEQ ID N.º 2) y la región objetivo del genoma EI del VPH18 5'-tcagatagtggtatggctgtt-3' (SEQ ID N.º 47) que es objetivo del cebador inverso. Se muestra el cebador inverso VPH 15/45 R 5'-aacagccatagccactatctga-3' (SEQ ID N.º 15), que es el complemento inverso de la región objetivo del genoma EI del VPH18 en la SEQ ID N.º 47. También se muestra la secuencia objetivo de la sonda pan-VPH 5'-aaacgaaagt-3' (SEQ ID N.º 34) para la hibridación de la sonda pan-VPH (SEQ ID N.º 34) 5'-actttcgttt-3' (SEQ ID N.º 25), que es el complemento inverso de la SEQ ID N.º 25. La región objetivo de VPH16 amplificada para la detección utilizando la sonda pan-VPH son los nucleótidos 1134 a 1331.

La figura 5C muestra los nucleótidos 879 a 2813 del gen EI del VPH 33 (SEQ ID N.º 48), marcada para mostrar el cebador directo del VPH 33 5'-cagaagatgaggatgaacagcag-3' (SEQ ID N.º 3) y el sitio de unión objetivo del cebador directo del VPH 16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R 5'-agacagcggatggcaatac3' (SEQ ID N.º 49), y el sitio de unión objetivo del cebador inverso de VPH 16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R 5'-agacagcggatggcaatac3' (SEQ ID N.º 49), en el que hay una diferencia de bases a/g según se marca en relación con la secuencia objetivo para el cebador inverso del VPH 16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R, esto es, 5'-gtattgccataccgctgtct-3' (SEQ ID N.º 50) que muestra un desajuste c/t en el complemento inverso en comparación con el cebador (SEQ ID N.º 14) que se utiliza para la amplificación. La secuencia 5'-aagcgaagt-3' (SEQ ID N.º 36) es la región del HR-VPH 33n objetivo de la sonda VPH 33n, esta presenta una diferencia de nucleótido a/g en comparación con la región de consenso objetivo de la sonda pan-VPH (SEQ ID N.º 25). La secuencia 5'-actttcgctt-3' (SEQ ID N.º 26) es la sonda 33n del HR-VPH (complemento inverso de la SEQ ID N.º 36), que presenta una diferencia de nucleótido t/c al compararla con la sonda pan-VPH (SEQ ID N.º 25). La secuencia 5'-aaacgaaagt-3' (SEQ ID N.º 34) es la secuencia objetivo para la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 33. La secuencia 5'-actttcgttt-3' (SEQ ID N.º 25) es la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 33 (SEQ ID N.º 25), que es el complemento inverso de la SEQ ID N.º 34). La región objetivo de VPH33 (y 33n) amplificada para la detección utilizando la sonda pan-VPH son los nucleótidos 976 a 1285.

La figura 5D muestra los nucleótidos 862 a 2751 del gen EI del VPH 31 (SEQ ID N.º 51), marcados para mostrar las posiciones del cebador directo VPH 31 5'-gaggaacatgcagaggctgt-3' (SEQ ID N.º 4) y la secuencia objetivo para el cebador inverso VPH16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R 5'-agacagcggatggcaatac-3' (SEQ ID N.º 45). La secuencia 5'-gtattgccataccgctgtct-3' (SEQ ID N.º 14) es el cebador inverso para VPH16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R (SEQ ID N.º 14) que es el complemento inverso de la región objetivo mostrada en la SEQ ID N.º 45). La secuencia 5'-aaacgaaagt-3' (SEQ ID N.º 34) es la secuencia objetivo para la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 31. La secuencia 5'-actttcgttt-3' (SEQ ID N.º 25) es la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 31 (SEQ ID N.º 25), que es el complemento inverso de la SEQ ID N.º 34). La región objetivo amplificada para la detección del VPH31 son los nucleótidos 1087 a 1268.

La figura 5E muestra los nucleótidos 868 a 2781 del gen EI del VPH 35 (SEQ ID N.º 52), marcados para indicar las posiciones del cebador directo VPH 35 5'-atgcacaggaggagcaaca-3' (SEQ ID N.º 5) y la región objetivo para el cebador inverso VPH16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R la secuencia genómica 5'-agacagcggatggcaattc-3' (SEQ ID N.º 53) muestra las dos diferencias de nucleótidos t/g y t/a entre la secuencia objetivo de VPH35 y la secuencia objetivo para el cebador inverso. La secuencia 5'-gaattgccataaccgctgtca-3' (SEQ ID N.º 54), complementaria a la SEQ ID N.º 53, muestra las dos diferencias de nucleótidos t/a y a/c respecto al cebador inverso (SEQ ID N.º 14). La secuencia 5'-agacagcggatggcaatac-3' (SEQ ID N.º 45) es la secuencia objetivo para el cebador inverso VPH16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R. La secuencia 5'-gtattgccataccgctgtct-3' (SEQ ID N.º 14) es el cebador inverso VPH16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R utilizado para la amplificación del VPH35 (SEQ ID N.º 14), que es el complemento inverso de la SEQ ID N.º 45). La secuencia 5'-aaacgaaagt-3' (SEQ ID N.º 34) es la secuencia objetivo de consenso para la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 35. La secuencia 5'-actttcgttt-3' (SEQ ID N.º 25) es la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 35 (que es el complemento inverso de la SEQ ID N.º 34). La región objetivo del gen EI de VPH35 amplificada para la detección son los nucleótidos 1082 a 1276.

La figura 5F muestra los nucleótidos 928 a 2871 del gen EI del VPH 39 (SEQ ID N.º 55), marcados para mostrar la posición del cebador directo 39F 5'-gtgagacagcacaggctactttac-3' (SEQ ID N.º 6), y la región objetivo para el cebador inverso VPH16/31/33/35/39/52/56/58/66R 5'-agacagcggatggcaatac-3' (SEQ ID N.º 49), que muestra la diferencia de nucleótido a/g entre la secuencia objetivo de VPH39 y la secuencia objetivo para el cebador inverso. La secuencia 5'-gtattgccataccgctgtct-3' (SEQ ID N.º 50) muestra la diferencia de nucleótido c/t en el complemento inverso de la SEQ ID N.º 49), que es el cebador inverso utilizado para la amplificación de VPH16/31/33/35/39/52/56/58/66R (SEQ ID N.º 14), y presenta un nucleótido «c» en la posición marcada. La secuencia 5'-aaacgaaagt-3' (SEQ ID N.º 34) es la secuencia objetivo de consenso para la sonda pan-VPH

utilizada para la detección del VPH 39. La secuencia 5'-actttcgttt-3' (SEQ ID N.º 25) es la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 39 (SEQ ID N.º 25), que es el complemento inverso de la SEQ ID N.º 34. El objetivo amplificado para la detección del VPH39 son los nucleótidos 1115 a -1339.

5 La figura 5G muestra los nucleótidos 914 a 2845 del gen EI del VPH 45 (SEQ ID N.º 56), marcados para indicar el cebador directo del VPH 45 F 5'-ccatgctgcagggaagttcag-3' (SEQ ID N.º 7), y la región objetivo para el cebador inverso VPH 18/45 R 5'-tcagatagtggtatggctgtt-3' (SEQ ID N.º 47), esta región es objetivo del cebador inverso tanto para VPH 18 y 45. La secuencia 5'-aacgccaatagccactatctga-3' (SEQ ID N.º 15) es el cebador inverso para el VPH 18/45 R (complemento inverso de la SEQ ID N.º 47). La secuencia 5'-aaacgaaagt-3' es la secuencia objetivo de consenso para la sonda pan-VPH utilizada para la detección de VPH 45. La secuencia 5'-actttcgttt-3' (SEQ ID N.º 25) es la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 45 (SEQ ID N.º 25), que es el complemento inverso de la SEQ ID N.º 34. El objetivo amplificado para la detección del VPH45 son los nucleótidos 1123-1331.

15 La figura 5H muestra la región del genoma del VPH51 que contiene el gen VPH51 (SEQ ID N.º 57), marcada para mostrar el cebador directo VPH 51 F 5'-acaagaggctgtgcatcag-3' (SEQ ID N.º 8), y la secuencia objetivo para el cebador inverso VPH 51 R 5'-actggacagttatccggacag-3' (SEQ ID N.º 58). La secuencia 5'-ctgtccggataactgtccagt-3' (SEQ ID N.º 16) es el cebador inverso para el VPH 51 R (complemento inverso de la SEQ ID N.º 58). La secuencia 5'-aaacgaaagt-3' (SEQ ID N.º 34) es la secuencia objetivo de consenso para la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 51. La secuencia 5'-actttcgttt-3' (SEQ ID N.º 25) es la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 51 (SEQ ID N.º 25), que es el complemento inverso de la SEQ ID N.º 34. La región objetivo del gen EI de VPH51 amplificada para la detección son los nucleótidos 1103 -1256.

20 La figura 5I muestra los nucleótidos 864 a 2807 del gen EI del VPH 52, marcados para mostrar las posiciones del cebador directo VPH 52 5'-gaagggaggatgattacatgc-3' (SEQ ID N.º 9), y la región objetivo para el cebador inverso VPH 16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R 5'-agacagcgggtatggcaatag-3' (SEQ ID N.º 60), existen dos diferencias de nucleótidos g/c y c/g según se muestra entre la secuencia objetivo VPH52 y la secuencia objetivo del cebador inverso. La secuencia 5'ctattgccatagccgctgtct-3' (SEQ ID N.º 61) es el complemento inverso de la SEQ ID N.º 60), y existen dos diferencias de nucleótidos según se muestra, c/g y g/c, entre el complemento inverso y el cebador inverso VPH 16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R (SEQ ID N.º 14) utilizado para la amplificación de VPH52. La secuencia 5'-aaacgaaagt-3' (SEQ ID N.º 34) es la secuencia objetivo de consenso para la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 52. La secuencia 5'-actttcgttt-3' (SEQ ID N.º 25) es la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 52 (SEQ ID N.º 25), que es el complemento inverso de la SEQ ID N.º 34. La región objetivo amplificada para la detección del gen EI del VPH52 son los nucleótidos 1083-1269.

35 La figura 5J muestra los nucleótidos 895 a 2805 del gen EI del VPH 56 (SEQ ID N.º 62), marcados para mostrar las posiciones del cebador directo VPH 56/66 5'-gcaagtacaacagcacatgc-3' (SEQ ID N.º 10), y el objetivo del cebador inverso VPH 6/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R 5'-agacagcgggtatggcaatag-3' (SEQ ID N.º 45). La secuencia 5'-gtattgccataccgctgtct-3' (SEQ ID N.º 14) es el cebador inverso para VPH16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R (SEQ ID N.º 14) que es el complemento inverso de la región objetivo mostrada en la SEQ ID N.º 45). La secuencia 5'-aaacgaaagt-3' (SEQ ID N.º 34) es la secuencia objetivo de consenso para la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 56. La secuencia 5'-actttcgttt-3' (SEQ ID N.º 25) es la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 52 (el complemento inverso de la SEQ ID N.º 34). El objetivo amplificado para la detección del VPH 56/66 son los nucleótidos 1104 a 1267.

40 La figura 5K muestra los nucleótidos 895 a 2787 del gen EI del VPH 66 (SEQ ID N.º 63), marcados para indicar la posición del cebador directo VPH 56/66 5'-gcaagtacaacagcacatgc-3' (SEQ ID N.º 10), y el objetivo para el cebador inverso VPH16/31/33/35/39/52/56/58/66R 5'-agacagcgggtatggcaatag-3' (SEQ ID N.º 64), nótese la diferencia de nucleótido c/t entre la secuencia objetivo para el cebador inverso y la secuencia objetivo del VPH 66. La secuencia 5'-gtattgccatacc<ctgtct-3' (SEQ ID N.º 65) muestra la diferencia de nucleótido g/a entre el complemento inverso de la SEQ ID N.º 64 y el cebador inverso VPH16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R (SEQ ID N.º 14) que se utiliza para la amplificación del VPH 66. La secuencia 5'-aaacgaaagt-3' (SEQ ID N.º 34) es la secuencia objetivo de consenso para la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 66. La secuencia 5'-actttcgttt-3' (SEQ ID N.º 25) es la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 56 (el complemento inverso de la SEQ ID N.º 34). La región objetivo amplificada para la detección del gen EI del VPH56/66 son los nucleótidos 1104-1262.

45 La figura 5L muestra los nucleótidos 883 a 2817 del gen EI del VPH 58 (SEQ ID N.º 66), marcados para mostrar las posiciones del cebador directo 58 F 5'-agcccgagcgtgtgtaatg-3' (SEQ ID N.º 11), y la región objetivo para el cebador inverso VPH16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R. La secuencia 5'-agacagcgggtatggcaatag-3' (SEQ ID N.º 49) muestra la diferencia de nucleótido g/a respecto a la secuencia objetivo del cebador inverso para VPH16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R. La secuencia 5'-gtattgccataiccgctgtct-3' (SEQ ID N.º 50) muestra la diferencia de nucleótido c/t entre el complemento inverso de la SEQ ID N.º 49 y el cebador inverso para VPH16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R que se utiliza para amplificar el VPH 58. La secuencia 5'-aaacgaaagt-3' (SEQ ID N.º 34) es la secuencia objetivo de consenso para la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 58. La secuencia 5'-actttcgttt-3' (SEQ ID N.º 25) es la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH

58 (el complemento inverso de la SEQ ID N.º 34). El objetivo amplificado para la detección del VPH 58 son los nucleótidos 1077 a 1289.

5 La figura 5M muestra los nucleótidos 872 a 2806 del gen EI del VPH 59 (SEQ ID N.º 67), marcados para mostrar las posiciones del cebador directo VPH 59 F 5'-ggcctgtttaatgtgcaggaag-3' (SEQ ID N.º 12), y la región objetivo para el cebador inverso 59 R 5'- gaaggttamtaacagtgccagaca-3' (SEQ ID N.º 68), en el que m indica un cambio de nucleótido c/a. La secuencia 5'-tgtctggcactgttaktaacctc-3' (SEQ ID N.º 17) es el cebador inverso utilizado para la amplificación del VPH 59 (complemento inverso de la SEQ ID N.º 68), k indica un cambio de nucleótido g/t. La secuencia 5'-aacgaaagt-3' (SEQ ID N.º 34) es la secuencia objetivo de consenso para la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 59. La secuencia 5'-acttctggtt-3' (SEQ ID N.º 25) es la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 59 (el complemento inverso de la SEQ ID N.º 34). La región objetivo amplificada para la detección del gen EI del VPH59 son los nucleótidos 1172-1265.

15 La figura 5N muestra los nucleótidos 824 a 2746 del gen EI del VPH 68 (SEQ ID N.º 69), marcados para mostrar la posición del cebador directo VPH 68 F 5'-caaacaggtgacacagtctcag-3' (SEQ ID N.º 13), y la secuencia objetivo para el cebador inverso VPH 68 R 5'-agcaaagtcgccaattacagga-3' (SEQ ID N.º 70). La secuencia 5'-tcctgtaatggcgacttgct-3' (SEQ ID N.º 18) es el cebador inverso para VPH68 (el complemento inverso de la SEQ ID N.º 70). La secuencia 5'-aacgaaagt-3' (SEQ ID N.º 34) es la secuencia objetivo de consenso para la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 68. La secuencia 5'-acttctggtt-3' (SEQ ID N.º 25) es la sonda pan-VPH utilizada para la detección del VPH 68 (el complemento inverso de la SEQ ID N.º 34). La región objetivo amplificada para la detección de EI del VPH68 son los nucleótidos 902-1137.

20 Las figuras 6A y 6B muestran las secuencias de las regiones EI del genoma del VPH de alto riesgo en las cepas de VPH 16 y 18 con las secuencias de las sondas y cebadores de acuerdo con varias formas de realización de la invención, y las regiones correspondientes del genoma del VPH con las que hibridan para la detección en el segundo canal de detección HEX 560 nm.

25 La figura 6A muestra los nucleótidos 865 a 2814 de la secuencia del gen EI del VPH 16 (SEQ ID N.º 44), marcados para mostrar la posición del cebador directo VPH 16 F HEX 5'taatggatggtttatgtagaggct-3' (SEQ ID N.º 19), para la amplificación del VPH16 para el segundo canal de detección (560nm) y la secuencia objetivo para el cebador inverso VPH 16 R HEX 5'-ataatgattatthaacacagggcag-3' (SEQ ID N.º 71). La secuencia 5'-ctgctgtgtaataatcattat-3' (SEQ ID N.º 20) es la secuencia del cebador VPH 16 R HEX (SEQ ID N.º 20), es el complemento inverso de la SEQ ID N.º 71. La secuencia 5'-atatcagatgacgag-3' (SEQ ID N.º 27/31/38) es la secuencia de la sonda HR VPH 16/18. El objetivo para la amplificación y detección del VPH 16 en el segundo canal de detección (560 nm HEX) son los nucleótidos 909-1051.

30 La figura 6B muestra los nucleótidos 914 a 2887 del gen EI del VPH 18 (SEQ ID N.º 46), marcados para mostrar las posiciones del cebador directo VPH 18 F HEX 5'-ggctgtgtttatgtacaagct-3' (SEQ ID N.º 21), y la región objetivo del cebador inverso VPH 18 R HEX 5'-aaggaacattttgigaacagg-3' (SEQ ID N.º 72), nótese que existe una diferencia de nucleótido c/t respecto a la secuencia genómica correspondiente de EI del VPH 18 mostrada en la SEQ ID N.º 46.

40 **[0044]** El complemento inverso de la secuencia 5'-cctgttcacaaaatgttcctt-3' (SEQ ID N.º 22) es la secuencia del cebador VPH18R HEX utilizado para la amplificación del VPH 18 en el segundo canal de detección (560nm HEX). La secuencia 5'-atatcigatgacgag-3' (SEQ ID N.º 27/31/39) es la secuencia del VPH 18 que muestra la diferencia de nucleótido A/T respecto a la sonda HR VPH 16/18 5'-atatcagatgacgag-3' (SEQ ID N.º 27/31/38). La región objetivo para VPH 18 en el segundo canal de detección (560 nm HEX) son los nucleótidos 959-1097.

Descripción detallada

45 **[0045]** Como se ha descrito anteriormente, y se presenta con más detalle en los ejemplos y dibujos adjuntos, un aspecto de la invención es una composición que comprende una sonda de ácidos nucleicos para el VPH descrito en el presente documento. La sonda puede estar marcada con cualquier marcada adecuada para su uso en PCR en tiempo real. Las marcas típicas son un fluorocromo y un extintor, situados en extremos opuestos de la sonda lineal, por ejemplo, el fluorocromo puede estar acoplado en el extremo 5' de la sonda y el extintor en el extremo 3'. La sonda puede presentar una secuencia de nucleótidos que comprenda o consista en una secuencia de sonda expuesta en el presente documento, o su secuencia complemento inversa (que corresponde a la secuencia objetivo de la región EI del genoma del VPH a la que se une la sonda). Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos puede ser la sonda pan-VPH ACTTTCGTTT (SEQ ID N.º 25), a la que también se hace referencia en el presente documento como sonda HR-VPH. El complemento inverso de esta secuencia es AACGAAAGT (SEQ ID N.º 42).

55 **[0046]** Preferiblemente, la sonda es una molécula de sonda LNA, en la que la secuencia de nucleótidos comprende nucleótidos LNA. Ventajosamente, las sondas que comprenden LNA permiten una longitud de secuencia menor para emplearse al mismo tiempo que siguen confiriendo especificidad de hibridación. Las sondas VPH de acuerdo con la presente invención son de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, las sondas pueden constar de hasta 15 nucleótidos de longitud y comprender una secuencia de sonda expuesta en el presente documento o su complemento inverso. Como se ha expuesto anteriormente, los nucleótidos LNA contienen un puente de metileno adicional en la molécula de desoxirribosa. Estos puentes de metileno adicionales están presentes opcionalmente en al menos 8, 9 o 10 de los nucleótidos de la sonda. Los puentes de metileno pueden

estar ausentes en algunos nucleótidos de la sonda. Más adelante, en el Ejemplo 1 (d), se presentan ejemplos de localizaciones exactas de puentes de metileno en secuencias de sonda.

5 **[0047]** Uno de los descubrimientos clave fundamentales de la presente invención es que dichas sondas cortas de LNA pueden estar dirigidas a regiones de homología entre tipos de VPH oncogénicos, y se pueden hibridar con la suficiente especificidad como para permitir que se detecten de forma específica una gran gama de cepas de VPH oncogénicas utilizando una única sonda o una pequeña cantidad de sondas, tal como 1, 2 o 3 sondas. Así, una sonda de acuerdo con la presente invención puede ser una sonda pan-VPH, capaz de hibridar con una pluralidad de VPH oncogénicos. Entre las cepas de VPH oncogénicas se incluyen VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH33n, 10 VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 o VPH68. Preferiblemente, las sondas pan-VPH de acuerdo con la invención tienen como objetivo una región del genoma del VPH en el gen E1, por ejemplo, según se muestra a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1

Cepa de VPH	Región objetivo del gen E1 del VPH para la amplificación / detección (p. ej., en el canal de primera dirección 530nm FAM)
16	1081 - 1274
18	1134 - 1331
31	1087 - 1268
33 / 33n	976 - 1285
35	1082 - 1276
39	1115 - 1339
45	1123 - 1331
51	1103 - 1256
52	1083 - 1269
56	1104 - 1267
58	1077 - 1289
59	1172 - 1265
66	1104 - 1262
68	902 - 1137

Preferiblemente, las sondas 16/18 de acuerdo con la invención tienen como objetivo una región del genoma del VPH en el gen E1, por ejemplo, según se muestra a continuación en la Tabla 2.

15

Tabla 2

Cepa de VPH	Región objetivo del gen E1 del VPH para la amplificación / detección (p. ej., en el canal de segunda dirección 560nm HEX)
16	909 -1051
18	959 -1097

[0048] Las sondas descritas en el presente documento se pueden proporcionar para su uso en la detección de VPH, incluyendo como parte de métodos de diagnóstico para detectar la presencia de VPH oncogénicos en muestras o para determinar de forma específica si una muestra de resultado positivo o negativo en VPH oncogénico. Una muestra puede ser cualquier material que pueda analizarse para VPH oncogénicos, como una muestra que comprenda material biológico de un sujeto, p. ej., un paciente humano. El material biológico se puede obtener a partir de un frotis cervical. Preferiblemente, la muestra es una muestra de citología de base líquida de un frotis cervical humano. Las sondas se optimizan para su uso para detectar VPH mediante PCR en tiempo real. Los cebadores adecuados para su uso en combinación con las sondas también se describen y representan otros aspectos de la invención.

[0049] Por consiguiente, un aspecto de la invención es un método para determinar si una muestra resulta positiva en VPH oncogénico, comprendiendo el método:

combinar la muestra con cebadores para la amplificación con PCR en tiempo real de una región objetivo de genomas de VPH oncogénicos, y una sonda pan-VPH marcada capaz de emitir una señal tras la amplificación de la región objetivo,

proporcionar condiciones para la PCR en tiempo real, y

medir una señal emitida desde la sonda pan-VPH marcada,

donde la detección de la señal indica que la muestra da un resultado positivo en VPH oncogénico.

[0050] En el presente documento se describen ejemplos de sondas pan-VPH, como la molécula LNA marcada que comprende la secuencia ACTTTTCGTTT (SEQ ID N.º 25) o su complemento inverso. La sonda pan-VPH puede ser una molécula marcada con 10 nucleótidos de la secuencia que consiste en ACTTTTCGTTT (SEQ ID N.º 25). En el presente documento se describen también ejemplos de cebadores adecuados. Preferiblemente, los cebadores se destinan a la amplificación de una región objetivo de cualquiera de VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 o VPH68. El método puede comprender combinar la muestra con una combinación de cebadores para la amplificación de todos estos tipos de VPH, permitiendo así la detección de cualquier tal VPH si está presente en la muestra.

[0051] Debido a que la sonda pan-VPH puede ser una diseñada para detectar específicamente cualquier VPH que pertenezca a un conjunto concreto de VPH oncogénicos (p. ej., el conjunto de VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 y VPH68), la detección de una señal desde la sonda pan-VPH marcada en un ensayo con todos estos cebadores indica por tanto que la muestra da resultado positivo en al menos uno de estos VPH oncogénicos, mientras que la ausencia de una señal en estas circunstancias indica que la muestra da resultado negativo para estos VPH oncogénicos. La prueba puede no proporcionar una seguridad absoluta, en vista de los límites de detección del ensayo, descritos en los ejemplos más adelante, pero se ha observado que los métodos de la invención ofrecen una precisión y consistencia excelentes con métodos alternativos de análisis de VPH oncogénicos. Si se desea, se pueden combinar métodos de la invención con una o más técnicas adicionales, como un examen visual de células en la muestra, para proporcionar una seguridad adicional respecto a la presencia o ausencia de VPH oncogénicos.

[0052] El uso de una pluralidad de sondas de distinta especificidad de VPH puede ampliar el abanico de VPH detectados y/o proporcionar información acerca del tipo de VPH presente en la muestra. Por ejemplo, la sonda pan-VPH de la SEQ ID N.º 25 se puede unir más débilmente a la región objetivo de VPH33n que a la región objetivo de otro VPH oncogénico, a causa de las diferencias en la secuencia del genoma de VPH33n en esta región. Por consiguiente, la invención proporciona una sonda complementaria para que VPH33n se hibride de manera más firme con la región objetivo en VPH33n. Los ejemplos de sondas 33n descritas en el presente documento comprenden la secuencia ACTTTTCGCTT (SEQ ID N.º 26) o su complemento inverso. La sonda 33n puede ser una molécula marcada con 10 nucleótidos de la secuencia que consiste en ACTTTTCGCTT (SEQ ID N.º 26). Puede ser una sonda LNA. Se puede combinar una sonda para VPH33n con una sonda pan-VPH en métodos de la invención. De forma conveniente, si ambas sondas se marcan de manera idéntica (p. ej., con el mismo fluorocromo), entonces emitirán una señal común (p. ej., fluorescencia con la misma longitud de onda). Por lo tanto, la detección de esta señal indica la presencia de cualquier VPH unido por la sonda pan-VPH o la sonda 33n, por

ejemplo, puede indicar la presencia de cualquier VPH oncogénico perteneciente al conjunto de VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH33n, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 y VPH68.

[0053] Así, un método para determinar si una muestra resulta positiva en VPH oncogénico puede comprender además combinar la muestra con cebadores para la amplificación de una región objetivo de VPH33n, y una sonda 33n marcada capaz de emitir una señal tras la amplificación de la región objetivo, donde la sonda 33n y la sonda pan-VPH presentan la misma marca.

proporcionar condiciones para la PCR en tiempo real, y

medir una señal emitida desde la sonda marcada 33n o la sonda pan-VPH, donde

la detección de la señal indica que la muestra da un resultado positivo en VPH oncogénico.

[0054] Otro aspecto de la invención es un método para analizar de forma específica una muestra para VPH16 y/o VPH18. La detección de estas cepas de VPH resulta de especial importancia, debido a que se cree que el VPH 16 y el VPH 18 presentan el potencial oncogénico más elevado y se les relaciona con el riesgo más alto de cáncer cervical. Se puede llevar a cabo un método de detección de VPH16/18 de forma independiente, pero resulta ventajoso combinarlo con el método de detección pan-VPH descrito anteriormente para proporcionar la información adicional con respecto a si el VPH presente en la muestra es del tipo VPH 16 o VPH 18 o pertenece a una cepa distinta del virus.

[0055] Por consiguiente, el método para determinar si una muestra resulta positiva en VPH oncogénico puede comprender además determinar si la muestra resulta positiva en VPH16 o VPH18, y puede comprender:

combinar la muestra con cebadores para la amplificación con PCR en tiempo real de una región objetivo de los genomas de VPH16 y VPH18, y una sonda marcada de 16/18 capaz de emitir una señal tras la amplificación de la región objetivo,

proporcionar condiciones para la PCR en tiempo real, y medir una señal de la sonda marcada de 16/18,

donde la detección de una señal indica que la muestra da un resultado positivo en VPH16 o VPH18.

[0056] En el presente documento se exponen ejemplos de sondas para VPH16 y VPH18, e incluyen una molécula de LNA que comprende la secuencia ATATCWGATGACGAG (SEQ ID N.º 27) o su complemento inverso.

[0057] Para mejorar la resolución de la señal de VPH 16/18 desde la señal pan-VPH en un método de detección combinada, la sonda 16/18 puede estar marcada de manera distinta (p. ej., con un fluorocromo diferente), de tal forma que emita una señal distinta (p. ej., fluorescencia con una longitud de onda diferente) respecto a la sonda pan-VPH.

[0058] En el método se pueden incluir, según se desee, controles positivos y/o negativos. Normalmente, llevar a cabo un control positivo para la PCR en tiempo real comprenderá combinar la muestra con cebadores para la amplificación con PCR en tiempo real de una secuencia de ADN control (p. ej., de ADN humano) presente en la muestra, y una sonda control marcada capaz de emitir una señal tras la amplificación de la secuencia de ADN control, proporcionar condiciones para la PCR en tiempo real y medir una señal desde la sonda control, donde la detección de la señal indica que la PCR en tiempo real es funcional. Preferiblemente, conforme se represente en los Ejemplos, los métodos de la invención se realizan en multiplex. Por lo tanto, las sondas multiplex (cualquiera de entre dos o más, o todas, de: sonda pan-VPH, sonda 33n, sonda 16/18 y la sonda control) y sus correspondientes cebadores para la PCR en tiempo real se pueden incluir en una única mezcla de reacción. El uso de marcas diferentes y la detección de señales con distintos canales (p. ej., fluorescencia con distintas longitudes de onda) permite distinguir las señales de distintas sondas. La mezcla de reacción contendrá tampones adecuados y otros reactivos para la PCR en tiempo real. Se conocen ejemplos de reactivos y condiciones de reacción para la PCR, y se proporcionan en los Ejemplos.

[0059] A continuación se presentan formas de realización de la invención.

Ejemplo I. Forma de realización de la prueba de diagnóstico

[0060] En esta forma de realización, se determinó en una muestra de ensayo la presencia de todos los virus VPH oncogénicos estudiados y la presencia de los tipos de VPH 16 y 18.

[0061] Preferiblemente, la muestra control positiva se preparó a partir de una secuencia de nucleótidos de VPH 16 y un fragmento de una secuencia de beta globina humana.

[0062] Preferiblemente, se aplicaron una muestra control positiva y una muestra control negativa en cada ensayo. En esta forma de realización, la muestra control positiva indica la exactitud de la reacción llevada a cabo (ausencia de degradación de la muestra control positiva, actividad adecuada de los reactivos, perfil térmico correcto del dispositivo, ausencia de inhibición de la reacción). Una muestra control negativa permite verificar si se ha contaminado el eluido de ADN y los reactivos con material biológico que contenía VPH o productos de PCR amplificados durante el aislamiento de ADN y la preparación de la reacción de amplificación. En caso de detectar

una señal positiva en al menos un canal de detección para la muestra control negativa, significa que se ha contaminado la muestra control negativa o los reactivos.

[0063] Asimismo, se utilizó un control interno (IC), comprendiendo un fragmento de una secuencia de beta globina, aplicado para confirmar si cada muestra de ensayo clínica contenía una cantidad de ADN suficiente, necesaria para detectar HR-VPH. Además, una señal desde el control interno indica un aislamiento del ADN llevado a cabo de forma adecuada y la ausencia de inhibidores de reacción. Preferiblemente, la muestra control positiva comprende una secuencia del control interno. La muestra control negativa debería producir resultados negativos en tres canales de detección.

1. Secuencias de cebadores, sondas y muestras control utilizadas de la invención

[0064]

a)

secuencia de oligonucleótidos del cebador para el primer canal FAM de 530 nm:

SEQ ID N.º:	CEBADOR	ORIENTACIÓN	SECUENCIA DEL CEBADOR
1	VPH 16 F	Directo	5'-GCACAGGAAGCAAAACAACATAG-3'
2	VPH 18 F	Directo	5'-AGGT C CACAAT GAT GCACAAG-3'
3	VPH 33/33n F	Directo	5'-CAGAAGATGAGGATGAAACAGCAG-3'
4	VPH 31 F	Directo	5'-GAGGAACATGCAGAGGCTGT-3'
5	VPH 35 F	Directo	5'-ATGCACAGGAGGAGCAAACA-3'
6	VPH 39 F	Directo	5'-GTGAGACAGCACAGGTACTTTTAC-3'
7	VPH 45 F	Directo	5'-C CAT GC GCAGGAAGTT CAG-3'
8	VPH 51 F	Directo	5'-ACAAAGAGGCT GT GCAT CAG-3'
9	VPH 52 F	Directo	5'-GAAGGGGAGGATGATTTACATGC-3'
10	VPH 56/66 F	Directo	5'-GCAAGTACAAACAGCACAT GC-3'
11	VPH 58 F	Directo	5'-AGCCCGAGCGTTGTTTAATG-3'
12	VPH 59 F	Directo	5'-GGCCTT GTTTAATGTGCAGGAAG-3'
13	VPH 68 F	Directo	5'-CAAACAGGT GACACAGT CT CAG-3'
14	VPH 16/31/33/ 33n/35/39/52 /56/58/66R	Inverso	5'-GTATTGCCATACCCGCTGTCT-3'
15	VPH 18/45 R	Inverso	5'-AACAGC CATAGC CACTAT CT GA-3'
16	VPH 51 R	Inverso	5'-CTGTCCGGATAACTGTCCAGT-3'

ES 2 684 746 T3

SEQ ID N.º:	CEBADOR	ORIENTACIÓN	SECUENCIA DEL CEBADOR
17	VPH 59 R	Inverso	5'-TGTCTGGCACTGTTAKTAACCTTC-3'
18	VPH 68 R	Inverso	5'-TCCTGTAATGGCGACTTTGCT-3'

donde «K» significa un cambio de base G/

b)

secuencia de oligonucleótidos del cebador para el segundo canal HEX de 560 nm:

SEQ ID N.º:	CEBADOR	ORIENTACIÓN	SECUENCIA DEL CEBADOR
19	VPH 16 F HEX	Directo	5'-TAATGGATGGTTTTATGTAGAGGCT-3'
20	VPH 16 R HEX	Inverso	5'-CTGCCTGTGTAAATAAT CATTAT-3'
21	VPH 18 F HEX	Directo	5'-GGCTGGTTTTATGTACAAGCT-3'
22	VPH 18 R HEX	Inverso	5'-CCTGTTACAAAATGTTTCCTT-3'

5 c)

secuencia de oligonucleótidos del cebador para el tercer canal ROX de 610 nm - control interno:

SEQ ID N.º:	CEBADOR	ORIENTACIÓN	SECUENCIA DEL CEBADOR
23	HBE1 IC F	Directo	5'-GAGAACTTCAAGGTGAGTTCAGGT-3'
24	HBE1 IC R	Inverso	5'-GAAGTCTGCTGTTCTAACATCAAG-3'

d)

secuencia de oligonucleótidos de la sonda:

Sonda	Secuencia de la sonda
HR-VPH (pan-VPH) SEQ ID N.º 29	5'-6FAM-A+C+T+T+T+C+G+T+TT-BHQ-1-3'
33n SEQ ID N.º: 30	5'-6FAM-A+C+T+T+T+C+G+C+TT-BHQ-1-3'
16/18 SEQ ID N.º: 31	5'-HEX-AT+AT+CW+GA+T+G+AC+G+AG-BHQ-1-3'
IC SEQ ID N.º: 32	5'-ROX-TGACATTAATTGAAGCTCATAATCTTATTG-BHQ-2-3'

donde «+» significa un nucleótido LNA que contiene un puente de metileno adicional en la desoxirribosa; «W» significa un cambio de base A/T.

2. Concentraciones aplicadas de cebadores y sondas en la mezcla de reacción de la invención**[0065]**

a)

5 Las concentraciones finales de los cebadores en la mezcla de reacción para el primer canal FAM de 530 nm fueron:

N.º	CEBADOR	Concentración final en la mezcla [pM]	Concentración inicial [pM]
1	VPH 16 F	0,22	4
2	VPH 18 F	0,22	4
3	VPH 31 F	0,22	4
4	VPH 33/33n F	0,22	4
5	VPH 35 F	0,22	4
6	VPH 39 F	0,22	4
7	VPH 45 F	0,22	4
8	VPH 51 F	0,22	4
9	VPH 52 F	0,22	4
10	VPH 56/66 F	0,22	4
11	VPH 58 F	0,22	4
12	VPH 59 F	0,22	4
13	VPH 68 F	0,22	4
14	VPH 16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R	0,22	4
15	VPH 18/45 R	0,22	4
16	VPH 51 R	0,22	4
17	VPH 59 R	0,22	4
18	VPH 68 R	0,22	4

b)

Las concentraciones finales de los cebadores en la mezcla de reacción para el segundo canal HEX de 560 nm fueron:

N.º	CEBADOR	Concentración final en la mezcla [pM]	Concentración inicial [pM]
19	VPH 16 F HEX	0,06	8
20	VPH 16 R HEX	0,06	8
21	VPH 18 F HEX	0,06	8
22	VPH 18 R HEX	0,06	8

5

c)

Las concentraciones finales de los cebadores en la mezcla de reacción para el tercer canal ROX de 610 nm (control interno) fueron:

N.º	CEBADOR	Concentración final en la mezcla [pM]	Concentración inicial [pM]
23	HBE1 IC F	0,2	8
24	HBE1 IC R	0,2	8

10

d)

Las concentraciones finales de las sondas en la mezcla de reacción fueron:

N.º	SONDA	Concentración final en la mezcla [iM]	Concentración inicial [iM]
25	HR-VPH	0,36	8
26	33n	0,36	8
27	16/18	0,06	8
28	IC	0,2	3,6

[0066] Se prepararon cantidades apropiadas de cebadores y sondas en las concentraciones expuestas anteriormente.

15

Antes de preparar la mezcla, todos los ingredientes se agitaron con un vórtex y se centrifugaron. Posteriormente, la mezcla se dividió en porciones adecuadas, que se colocaron en tubos de ensayo.

3. Descripción del análisis Master MIX MabPROBE

20

[0067] Real-Time Master Mix MabProbe es una mezcla concentrada 2,083x para la PCR en tiempo real. Contiene una polimerasa Taq bloqueada con un anticuerpo monoclonal y otros ingredientes necesarios para la PCR en tiempo real. Los ingredientes de la mezcla se combinaron en proporciones adecuadas en la mezcla final, cuyo uso reduce el riesgo de contaminación y de error humano. El kit comprende:

- Master MIX MabPROBE
- Una mezcla de sondas y cebadores

- Una muestra control positiva
- Una muestra control negativa
- Agua

[0068] Composición de la mezcla Master MIX MabPROBE:

- 5
- Polimerasa Run Mab 0,104 U/[μ l]
 - Tampón de reacción: Tris-HCl 20,83 mM pH 8,0, KC1 104 mM MgCl₂ - 10,42 mM
 - dNTPs - 2,75 mM (0,69 mM de cada dNTP)
 - Estabilizadores de PCR

10 **[0069]** Todos los componentes del ensayo se deberían almacenar a -20°C en un lugar oscuro. Descongelar y congelar de nuevo los componentes no provoca ningún deterioro de su actividad. Se deben transportar en hielo seco.

4. Protocolo de ensayo:

[0070]

15 **a.** Todos los ingredientes se deben colocar sobre hielo. Los cebadores, las sondas y la mezcla Master Mix MabPROBE, la muestra control positiva y la muestra control negativa se deben agitar con un vórtex y centrifugar brevemente.

20 **b.** En la siguiente tabla, se muestran las cantidades de los ingredientes para una reacción. Para realizar más análisis, es necesario recalcular de forma adecuada la composición de la mezcla, teniendo en cuenta las muestras de ensayo, el control positivo y el control negativo. La adición de una enzima UNG en una disolución de 1:200 es opcional, y se puede sustituir por agua. Se deben mezclar cantidades adecuadas de los componentes individuales en un tubo de ensayo de 1,5 ml del tipo Eppendorf, y a continuación la mezcla resultante se debe agitar con un vórtex y centrifugar brevemente.

Composición de la mezcla para una única reacción en 25 μ l

Ingredientes	Cantidad para una reacción en 25 μ l		
Master MIX MAB	12		
CEBADORES+SONDAS	6		
H ₂ O u opcionalmente 1IHNTG (1:200)	1		
ADN	6		
	Tiempo	Temperatura °C	Número de ciclos
Hidrólisis de UNG	20 minutos	37 °C	1
Desnaturalización	15 minutos	95 °C	1
Amplificación	20 segundos 75 segundos	95 °C 60 °C	40-50* se debe optimizar el número de ciclos

Ingredientes	Cantidad para una reacción en 25 µl		
	Tiempo	Temperatura °C	Número de ciclos
Enfriamiento	30 segundos	37 °C	1

El ensayo se verificó con los siguientes aparatos:

[0071] LightCycler 2.0, LightCycler Roche 96, LightCycler Roche 480, Biorad CFXTouch Los dispositivos, que necesitan una compensación del color, los proporciona el fabricante del ensayo con un archivo en el formato correcto o un kit de tintes para la compensación propia.

5 **5. Interpretación de los resultados**

[0072] De acuerdo con la invención, la presencia del virus en una muestra específica se demuestra mediante la amplificación de un producto que comprende su par específico de cebadores. 1 La enzima UNG no se proporciona con el kit. Se puede adquirir a través de la empresa Fermentas en una concentración de 1 (J.1/U).

10

[0073] La cantidad recomendada de matriz ADN es de 10 pg-1 µg. El volumen máximo del eluido de ADN añadido es de 6 µl. La cantidad y el volumen del eluido de ADN añadido depende del aislamiento de ADN y es objeto de optimización. En caso de que las cantidades añadidas sean menores de 6 µl, la cantidad que falta se debe reemplazar con agua.

15

- c. Colocar 19 µl de la mezcla en tubos de ensayo destinados al aparato utilizados para realizar la reacción.
- d. A continuación, añadir sucesivamente a cada tubo 6 µl del control positivo de ADN del ensayo y del control negativo, repipeteando varias veces. La mezcla preparada de esta forma se debe centrifugar brevemente.
- e. Colocar las muestras en un termociclador. Programa del termociclador:

20

[0074] En la presente forma de realización, el producto de reacción, que indica la presencia de un virus VPH, se identificó por medio de un análisis de una curva de crecimiento logarítmica formada como resultado del cambio de fluorescencia observado en la muestra de ensayo. Las muestras positivas se caracterizaron por un aumento logarítmico del nivel de fluorescencia con respecto al nivel relativamente constante de fluorescencia en las muestras negativas. Preferiblemente, el análisis se realizó utilizando controles apropiados: negativo, positivo e interno. La imagen resultante se muestra en las figuras 1-3.

25

[0075] En la figura 1, se presentan los resultados de una PCR en tiempo real para todos los tipos de VPH de ensayo oncogénicos, preferiblemente utilizando una muestra control positiva, una muestra control negativa y positiva y una muestra clínica negativa. De acuerdo con la forma de realización de la invención, la presencia o ausencia de VPH oncogénico en las muestras examinadas se lee en un canal de detección de 530 nm. Un incremento logarítmico del producto de PCR en la muestra clínica positiva indica la presencia de al menos uno del grupo de todos los tipos de VPH oncogénicos investigados. La ausencia de crecimiento logarítmico del producto de PCR en la muestra clínica negativa demuestra una ausencia de VPH oncogénicos. Preferiblemente, se aplicó una muestra control positiva y negativa en el canal de detección de 530 nm. Para facilitar la interpretación de los resultados, es preferible una comparación de la muestra control con muestras de ensayo clínicas.

30

[0076] En la figura 2, se presentan los resultados de una PCR en tiempo real para los tipos de VPH 16 y 18, preferiblemente utilizando una muestra control positiva, una muestra control negativa y positiva y una muestra clínica negativa. De acuerdo con la forma de realización de la invención, la presencia o ausencia de VPH 16 o 18 en las muestras examinadas se lee en un canal de detección de 560 nm. Un incremento logarítmico del producto de PCR en la muestra clínica positiva indica la presencia de al menos uno de los tipos de VPH 16 y 18 oncogénicos investigados. La ausencia de crecimiento logarítmico del producto de PCR en la muestra clínica negativa demuestra una ausencia de VPH 16 y 18 oncogénicos. Preferiblemente, se aplicó una muestra control positiva y negativa en el canal de detección de 560 nm. Para facilitar la interpretación de los resultados, es preferible una comparación de la muestra control con muestras de ensayo clínicas.

40

[0077] En la figura 3, se presentan los resultados de una PCR en tiempo real para el control interno (IC), preferiblemente utilizando una muestra control positiva, una muestra control negativa y positiva y una muestra clínica negativa. De acuerdo con la forma de realización de la invención, la presencia o ausencia del control interno (IC) en las muestras examinadas se lee en un canal de detección de 610 nm. Un crecimiento logarítmico del

45

producto de PCR en la muestra control positiva y en las muestras clínicas positiva y negativa indica la presencia de un fragmento de beta globina humana y pruebas para el trascurso correcto de la reacción y la cantidad de ADN adecuada necesaria para detectar todos los tipos de VPH oncogénicos investigados. Es de esperar una ausencia de crecimiento logarítmico del producto de PCR en la muestra clínica negativa, lo cual sugiere ausencia de contaminación con ADN humano o el producto de PCR amplificado. Para facilitar la interpretación de los resultados, es preferible una comparación de la muestra control con muestras de ensayo clínicas.

[0078] La presente forma de realización no es un ejemplo que limite el alcance de la invención. El producto de reacción puede ser identificado mediante cualquier método conocido por expertos en la materia.

[0079] Preferiblemente, se puede secuenciar para identificar cualquier secuencia específica del virus presente en la muestra examinada. A continuación se presenta un ejemplo de producto de PCR obtenido a partir del par de cebadores VPH 16 F y VPH 16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R (SEQ ID N.º 43):

VPH 16 F

```
5 ' GC AC AGGAAGC AAAAC AAC AT AGAGATGCAGT AC AGGTTCT AAAACGAAAGT
ATTTGGGTAGTCCACTTAGTGATATTAGTGGATGTGTAGACAATAATATTAGTCC T AG ATT
A A A AGC T AT AT GT AT AGA A A A AC A AAGT AGAGC T GC A A A AGGAGATT ATTT
GAAAGCGAAGAC AGCGGGT AT GGC AAT AC3 '
```

VPH16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R

Ejemplo II. Evaluación de la eficacia de distintos kits de cebadores y sondas moleculares para la detección de tipos de VPH oncogénicos

[0080] El primer paso implicó una modificación de la composición de los cebadores y sondas moleculares descritas anteriormente, para separar un canal de detección adicional para VPH 16/18. De acuerdo con los datos epidemiológicos, VPH 16 y VPH 18 se caracterizan por el elevado potencial oncológico y riesgo de desarrollo de cáncer cervical en mujeres infectadas. Por consiguiente, se recomienda que los ensayos de VPH utilizados para fines clínicos y, en concreto, para pruebas de cribado basado en la población permitan no solo identificar una infección con VPH oncogénicos, sino también determinar la presencia de VPH 16/18 en la muestra examinada. Por lo tanto, se diseñó un kit adicional de cebadores y una sonda molecular que permitía la distinción de VPH 16/18 en una única reacción con un sistema para un grupo de todos los tipos de VPH oncogénicos y un control interno. Como resultado de los estudios llevados a cabo, se obtuvieron 4 cebadores para VPH 16 y VPH 18 y una sonda corta TaqMan-LNA marcada con tinte fluorescente HEX, permitiendo la detección de amplicones en el canal de 560 nm. La región del genoma de VPH, situada a una distancia aproximada de 700 bp de la región de consenso para todos los tipos de VPH oncogénicos se seleccionó como secuencia objetivo para los cebadores y una sonda LNA común. En este caso, el sistema de control interno se modificó favorablemente para la PCR en tiempo real. Se eliminó el nucleótido sintético en favor de un gen humano de referencia para la beta globina. Se diseñaron 2 cebadores y una sonda TaqMan marcada con tinte ROX (canal de detección de 610 nm) para la amplificación en una única etapa de este gen junto con partículas de VPH, potencialmente presentes en la muestra. Como resultado, la mezcla de reacción objetivo contenía 26 cebadores y 4 sondas moleculares. Como consecuencia de la realización del ensayo en muestras citológicas previamente genotipadas, no se observó ningún producto del tipo cebador-dímero ni otro producto no específico de la amplificación de PCR.

[0081] El objetivo del análisis era confirmar si la configuración seleccionada de cebadores y sondas LNA-TaqMan se caracterizaba por la más alta eficacia en la detección de tipos de VPH oncogénicos en material citológico clínico. Se llevaron a cabo análisis comparativos del nuevo ensayo que comprendía un sistema potencialmente óptimo de cebadores y sondas mediante la evaluación de parámetros tales como la sensibilidad y especificidad de la detección de tipos de VPH oncogénicos, el umbral de detección de tipos de VPH individuales, incluidos todos los tipos oncogénicos, y la correlación de los resultados obtenidos con el ensayo de VPH validado clínicamente PapilloCheck (Greiner Bio-One), que está aprobado para su uso clínico con el certificado CE-IVD.

[0082] El análisis comprende 1256 pares de los resultados del nuevo ensayo para la presencia de tipos de VPH oncogénicos (hrVPH) y del ensayo validado PapilloCheck. El material se obtuvo a partir de mujeres residentes en la provincia de Zachodniopomorskie y en la provincia de Wielkopolska, quienes se presentaron para exámenes citológicos preventivos rutinarios, incluyendo 720 (57,3 %) pacientes con resultados citológicos normales y 536 (42,7 %) mujeres seleccionadas cuyo examen citológico reveló la presencia de células epiteliales anormales, pertenecientes a las categorías de diagnóstico ASC-US (n=249; 19,8 %), ASC-H (n=20; 1,6 %), L-SIL (n=232; 18,5 %) y H-SIL (n=34; 2,7 %) y L-SIL/H-SIL (n=1; 0,1 %). La edad media de las mujeres examinadas era de 33,4 ± 9,6 años de edad (rango: 16-66 años). Se aisló ADN para la PCR en tiempo real a partir de muestras citológicas (frotis cervicales) recogidas en un medio líquido SurePath (Becton Dickinson), utilizando un cepillo Cervex Brush Combi (Rovers). El aislamiento de ADN se realizó de forma automática utilizando cuentas magnéticas en un aparato NucliSense EasyMAG (Biomerieux). La amplificación de ADN se llevó a cabo en un aparato Light Cycler 96 (Roche). Se evaluaron cubreobjetos citológicos de capa fina, preparados utilizando un robot PrepStain (Becton

Dickinson), por parte de un equipo experimentado de citomorfólogos y patólogos utilizando cribado asistido por ordenador (sistema Focal Point GS, Becton Dickinson). Los resultados de los exámenes citológicos y de genética molecular llevados a cabo utilizando hrVPH y ensayos PapilloCheck se sometieron a un análisis estadístico. Se determinó el umbral de detección para los VPH seleccionados (un número mínimo de copias de partículas/genomas virales) en el ensayo hrVPH diseñado. Para este fin, se adquirieron materiales de referencia de VPH16 y VPH18 con un número conocido de copias de los virus mencionados (1er Estándar Internacional para el Virus del Papiloma Humano, National Institute for Biological Standards and Control, Reino Unido).

[0083] Se realizaron 11 disoluciones en serie de estándares de VPH16 y VPH18 para determinar las curvas estándar en tres series de repeticiones con el fin de definir los siguientes umbrales de detección utilizando PCR en tiempo real:

Estándar de VPH16: Canal HR-VPH (FAM) - disolución control 1:128 - 2×10^4 copias del virus canal VPH 16/18 (HEX) - disolución control 1:20 48 - $3,33 \times 10^3$ copias del virus

Estándar de VPH18: Canal HR-VPH (FAM) - disolución control 1:128 - 5×10^4 copias del virus canal VPH 16/18 (HEX) - disolución control 1:2048 - $1,92 \times 10^3$ copias del virus

[0084] Cabe destacar que el umbral de detección para VPH 16/18 en el segundo canal de detección es inferior en comparación con el grupo de todos los VPH oncogénicos en el primer canal de detección, lo cual parece ser un fenómeno favorable en lo que respecta a la eficacia clínica de los tipos de VPH del ensayo (objetivos con un mayor potencial oncogénico). También debe subrayarse que al tener en cuenta los coeficientes de correlación anteriormente descritos del nuevo ensayo y el ensayo de referencia PapilloCheck, se puede concluir que el umbral de detección de tipos de VPH oncogénicos es similar para ambos ensayos.

[0085] También se evaluaron las posibles reacciones cruzadas de los componentes del ensayo hrVPH con otros microorganismos. Para este fin, basándose en una revisión de la bibliografía disponible (incluyendo: P. Gajer *et al.* Temporal dynamics of the Human vaginal microbiota, *Science Translational Medicine* 2012, 4, 132ra52; S.S.Witkin, W.J. Ledger: Complexities of the uniquely human vagina. *Science Translational Medicine* 2012, 4, 132fsl1), se seleccionaron 42 cepas bacterianas, residentes fisiológicas típicas del aparato reproductor femenino, y patógenos que causan las infecciones más comunes del sistema genitourinario. Las cepas de referencia de las bacterias seleccionadas se adquirieron en el ATCC: The Global Bioresource Center, y comprendían: *Escherichia coli* ATCC 11775, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Proteus vulgaris* ATCC 6380, *Proteus mirabilis* ATCC 7002, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 49461, *Streptococcus agalactiae* (B) ATCC 12386, *Listeria monocytogenes* (4e) ATCC 19118, *Listeria monocytogenes* (4e) ATCC 19118, *Listeria innocua* (6a) ATCC 33090, *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992, *Lactococcus lactis* ATCC 19435, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Candida albicans* ATCC 10231, *Corynebacterium urealyticum* ATCC 43044, *Oligella urethralis* ATCC 17960, *Aerococcus viridans* ATCC 700406, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226, *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018, *Veillonella parvula* ATCC 10790, *Fusobacterium nucleatum* subsp. nucleatum ATCC 25586, *Gemella morbillorum* ATCC 27824, *Actinomyces odontolyticus* ATCC 17929, *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337, *Parvimonas micra* ATCC 33270, *Ureaplasma parvum* ATCC 27813, *Peptoniphilus asaccharolyticus* ATCC 14963, *Fingoldia magna* ATCC 29328, *Porphyromonas levii* ATCC 29147, *Prevotella loescheii* ATCC 15930.

[0086] Durante el transcurso de los experimentos realizados, no se obtuvo ninguna reacción cruzada entre el sistema diseñado de cebadores y sondas y los microorganismos mencionados anteriormente en el ensayo hrVPH.

[0087] Para concluir: el estudio resultó en el desarrollo de un kit óptimo de cebadores y mezcla de reacción favorables para una amplificación en una única etapa de tipos de VPH oncogénicos, VPH 16/18 y un control interno en tres canales de detección. Se realizaron estudios comparativos de la correlación del nuevo ensayo con los resultados del ensayo de referencia (PapilloCheck) en el grupo de 1256 mujeres para un posterior análisis estadístico. Se obtuvo un umbral de detección deseado desde el punto de vista clínico para VPH 16/18 y otros tipos de VPH oncogénicos similar al ensayo de referencia. No se observaron reacciones cruzadas del nuevo ensayo con otros microorganismos presentes en el aparato reproductor femenino, lo cual demuestra la elevada especificidad del ensayo.

Ejemplo III. Estadística y análisis de los resultados para la eficacia del nuevo ensayo de HR-VPH para detectar la presencia de virus VPH oncogénicos

[0088] Para determinar el valor diagnóstico del nuevo ensayo para HR-VPH, se midió su sensibilidad y especificidad en relación con el ensayo validado PapilloCheck (Greiner Bio-One). Se partió del supuesto de que este último ensayo se caracteriza por una precisión de diagnóstico óptima para infecciones de HR-VPH, incluidos VPH 16/18, como bien se describe en la bibliografía. Por lo tanto, se utilizó como referencia para el nuevo ensayo. Además, se determinaron los coeficientes de correlación para ambos ensayos. Este es un procedimiento estándar para aplicar en el caso de validación de pruebas cualitativas, que permite determinar si el estándar de referencia utilizado actualmente podría ser sustituido por un nuevo instrumento. El análisis se llevó a cabo basándose en los resultados de exámenes citológicos y de genética molecular, obtenidos por medio del NZOZ Meditest.

[0089] El nivel de correlación entre los resultados de los nuevos ensayos y los resultados del ensayo de referencia se basó en el valor del coeficiente de correlación tau b de Kendall. La sensibilidad y la especificidad del nuevo ensayo en comparación con el ensayo de referencia, entendidas como el porcentaje de los resultados de positivos verdaderos y negativos verdaderos, respectivamente, se evaluó basándose en el análisis ROC. Todos los cálculos estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete de *software* Statistica 10 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, Estados Unidos).

Detección de HR-VPH en la totalidad del grupo examinado

[0090] Se analizó un total de los resultados de 1256 pares de ensayos. El nuevo ensayo produjo 630 (50,2 %) resultados positivos y 626 (49,8 %) resultados negativos. El ensayo de referencia produjo 647 (51,5 %>) resultados positivos y 609 (48,5 %>) resultados negativos.

Prueba/resultado	Ensayo de referencia – resultado positivo	Ensayo de referencia – resultado negativo	Total
Nuevo ensayo - resultado positivo	612	18	630
Nuevo ensayo - resultado negativo	35	591	626
Total	647	609	1256

[0091] En el caso de 18 (2,9 %) resultados positivos del nuevo ensayo, el ensayo de referencia produjo un resultado negativo. En el caso de 35 (5,6 %>) resultados negativos del nuevo ensayo, el ensayo de referencia produjo un resultado positivo. El coeficiente de correlación tau b de Kendall para ambos ensayos fue de $b=0,9159327$.

[0092] El análisis ROC mostró que el nuevo ensayo se caracterizaba por una sensibilidad del 94,6 %> y una especificidad del 97,0 % en comparación con el ensayo de referencia.

Detección de VPH 16/18 en la totalidad del grupo examinado

[0093] Se analizó un total de los resultados de 1256 pares de ensayos. El nuevo ensayo produjo 230 (18,3 %>) resultados positivos y 1026 (81,7 %>) resultados negativos. El ensayo de referencia produjo 238 (18,9 %>) resultados positivos y 1018 (81,1 %) resultados negativos.

Prueba/resultado	Ensayo de referencia – resultado positivo	Ensayo de referencia – resultado negativo	Total
Nuevo ensayo - resultado positivo	223	7	230
Nuevo ensayo - resultado negativo	15	1011	1026
Total	238	1018	1256

[0094] En el caso de 7 (3,0 %) resultados positivos del nuevo ensayo, el ensayo de referencia produjo un resultado negativo. En el caso de 15 (1,5 %) resultados negativos del nuevo ensayo, el ensayo de referencia produjo un resultado positivo. El coeficiente de correlación tau b de Kendall para ambos ensayos fue de $b=0,9424401$.

[0095] El análisis ROC mostró que el nuevo ensayo se caracterizaba por una sensibilidad del 93,1 % y una especificidad del 99,3 % en comparación con el ensayo de referencia.

Detección de HR-VPH en el grupo con citología normal

[0096] Se analizó un total de los resultados de 720 pares de ensayos. El nuevo ensayo produjo 154 (21,4 %>) resultados positivos y 566 (78,6 %>) resultados negativos. El ensayo de referencia produjo 165 (22,9 %>) resultados positivos y 555 (77,1 %>) resultados negativos.

Prueba/resultado	Ensayo de referencia - resultado positivo	Ensayo de referencia - resultado negativo	Total
Nuevo ensayo - resultado positivo	145	9	154
Nuevo ensayo - resultado negativo	20	546	566
Total	165	555	720

[0097] En el caso de 9 (5,8 %>) resultados positivos del nuevo ensayo, el ensayo de referencia produjo un resultado negativo. En el caso de 20 (3,5 %>) resultados negativos del nuevo ensayo, el ensayo de referencia produjo un resultado positivo. El coeficiente de correlación tau b de Kendall para ambos ensayos fue de $b=0,8841279$.

- 5 **[0098]** El análisis ROC mostró que el nuevo ensayo se caracterizaba por una sensibilidad del 87,9 % y una especificidad del 98,4 % en comparación con el ensayo de referencia.

Detección de VPH 16/18 en el grupo con citología normal

[0099] Se analizó un total de los resultados de 720 pares de ensayos. El nuevo ensayo produjo 52 (7,2 %>) resultados positivos y 668 (92,8 %>) resultados negativos. El ensayo de referencia produjo 53 (7,4 %) resultados positivos y 667 (92,6 %) resultados negativos.

Prueba/resultado	Ensayo de referencia - resultado positivo	Ensayo de referencia - resultado negativo	Total
Nuevo ensayo - resultado positivo	49	3	52
Nuevo ensayo - resultado negativo	4	664	668
Total	53	667	720

- 10 **[0100]** En el caso de 3 (5,8 %>) resultados positivos del nuevo ensayo, el ensayo de referencia produjo un resultado negativo. En el caso de 4 (0,6 %>) resultados negativos del nuevo ensayo, el ensayo de referencia produjo un resultado positivo. El coeficiente de correlación tau b de Kendall para ambos ensayos fue de $b=0,9281394$.

[0101] El análisis ROC mostró que el nuevo ensayo se caracterizaba por una sensibilidad del 92,5 % y una especificidad del 99,6 % en comparación con el ensayo de referencia.

15 **Detección de HR-VPH en el grupo con citología anormal (ASC-US mínimo)**

[0102] Se analizó un total de los resultados de 536 pares de ensayos. El nuevo ensayo produjo 476 (88,8 %>) resultados positivos y 60 (11,2 %) resultados negativos. El ensayo de referencia produjo 482 (89,9 %>) resultados positivos y 54 (10,1 %>) resultados negativos.

Prueba/resultado	Ensayo de referencia - resultado positivo	Ensayo de referencia - resultado negativo	Total
Nuevo ensayo - resultado positivo	467	9	476
Nuevo ensayo - resultado negativo	15	45	60
Total	482	54	536

[0103] En el caso de 9 (1,9 %) resultados positivos del nuevo ensayo, el ensayo de referencia produjo un resultado negativo. En el caso de 15 (25,0 %) resultados negativos del nuevo ensayo, el ensayo de referencia produjo un resultado positivo. El coeficiente de correlación tau b de Kendall para ambos ensayos fue de $b=0,7658275$.

5 [0104] El análisis ROC mostró que el nuevo ensayo se caracterizaba por una sensibilidad del 96,9 % y una especificidad del 83,3 % en comparación con el ensayo de referencia.

Detección de VPH 16/18 en el grupo con citología anormal (ASC-US mínimo)

[0105] Se analizó un total de los resultados de 536 pares de ensayos. El nuevo ensayo produjo 178 (33,2 %>) resultados positivos y 358 (66,8 %>) resultados negativos. El ensayo de referencia produjo 185 (34,5 %>) resultados positivos y 351 (65,5 %>) resultados negativos.

Prueba/resultado	Ensayo de referencia - resultado positivo	Ensayo de referencia - resultado negativo	Total
Nuevo ensayo - resultado positivo	174	4	178
Nuevo ensayo - resultado negativo	11	347	358
Total	185	351	536

10 [0106] En el caso de 4 (2,2 %) resultados positivos del nuevo ensayo, el ensayo de referencia produjo un resultado negativo. En el caso de 11 (3,1 %>) resultados negativos del nuevo ensayo, el ensayo de referencia produjo un resultado positivo. El coeficiente de correlación tau b de Kendall para ambos ensayos fue de $b=0,9379317$.

[0107] El análisis ROC mostró que el nuevo ensayo se caracterizaba por una sensibilidad del 94,1 % y una especificidad del 98,9 % en comparación con el ensayo de referencia.

15 **Conclusiones**

[0108] El análisis de coeficientes tau b de Kendall reveló que los resultados del nuevo ensayo se caracterizaban por una correlación muy elevada con los resultados del ensayo de referencia PapilloCheck dentro del alcance de la detección de HR-VPH, con un intervalo del 76,6 % al 91,5 %. Se obtuvo un nivel de correlación incluso más elevado, cercano al umbral ideal del 95 % (de 92,8 %> a 94,2 %>) para la detección de VPH 16/18. La elevada precisión de diagnóstico del nuevo ensayo se ve confirmada por su alta sensibilidad (del 87,9 % al 96,9 % para hrVPH y del 92,5 % al 94,1 % para VPH 16/18) y especificidad (del 83,3 % al 98,4 % para HR-VPH y del 98,9 % al 99,3 % para VPH 16/18). La especificidad muy elevada del nuevo ensayo para la detección de VPH 16/18 merece una atención especial; los valores obtenidos demuestran que un resultado negativo del ensayo excluye la presencia de infección por VPH 16 o VPH 18 con una probabilidad de casi el 100 %. El hecho de que se observara un alto nivel de correlación, sensibilidad y especificidad del nuevo ensayo en ambos subgrupos de pacientes con resultados de examen citológico normales y anormales confirma la versatilidad de este método. Para concluir: Como resultado de las investigaciones llevadas a cabo, se obtuvo una correlación muy elevada de los resultados del ensayo hrVPH, de acuerdo con la invención, con los resultados del ensayo de referencia comercial clínicamente validado (PapilloCheck), y se confirmó la elevada sensibilidad y especificidad del ensayo hrVPH, de acuerdo con la invención, con respecto al ensayo de referencia (PapilloCheck).

Determinación de la eficacia clínica del nuevo ensayo de HR-VPH para detectar lesiones precancerosas y cáncer cervical

35 [0109] Se realizó un estudio clínico basado en la población, que implicó a 5000 mujeres, utilizando el nuevo ensayo de hrVPH en muestras de citología del cuello uterino recogidas en un medio líquido SurePath para su posterior análisis estadística de correlación con una imagen de microscopio y se determinó la eficacia clínica del nuevo ensayo.

[0110] El análisis tenía como objetivo determinar la utilidad clínica del nuevo ensayo de hrVPH en exámenes preventivos y en el diagnóstico de lesiones precancerosas y cáncer cervical. Para determinar la eficacia de diagnóstico del nuevo ensayo, se examinó a un grupo amplio de mujeres que se presentaron a exámenes citológicos rutinarios, suponiendo una parte de la profilaxis del cáncer cervical. Se determinó la correlación de los resultados de genética molecular obtenidos con la imagen de microscopio de cubreobjetos citológicos en un medio líquido, preparado utilizando el método normalizado SurePath de la empresa Becton Dickinson, y fue evaluada por parte de citomorfólogos y patólogos de acuerdo con el sistema de clasificación Bethesda de 2001. Con el fin de obtener una mayor objetivación de la evaluación microscópica, los cubreobjetos se evaluaron posteriormente utilizando un cribado automático asistido por ordenador (sistema FocalPoint de la empresa Becton Dickinson).

[0111] El análisis incluía 5000 pares de los resultados del nuevo ensayo para la presencia de HR-VPH y los resultados de exámenes citológicos en un medio líquido. El material se obtuvo a partir de sucesivas mujeres de la provincia de Zachodniopomorskie y de la provincia de Wielkopolska, quienes se presentaban a exámenes citológicos rutinarios. Se excluyó del análisis a pacientes a las que se les había solicitado pruebas para determinar la presencia de HR-VPH por el médico que les atendió y a mujeres con un historial de anomalías ginecológicas y oncológicas. La edad media de las mujeres examinadas era de $33,6 \pm 10,1$ años de edad (rango: 16-67 años). Los resultados del examen citológico comprendieron 4285 (96,5 %) preparaciones normales (sin células epiteliales anormales), 77 (1,55 %) preparaciones con lesiones correspondientes a ASC-US, 6 (0,1 %) preparaciones con lesiones correspondientes a ASC-H, 77 (1,55 %) preparaciones con lesiones correspondientes a L-SIL y 15 (0,3 %) preparaciones con lesiones correspondientes a H-SIL.

[0112] De forma similar a como se ha descrito anteriormente, se aisló ADN para la PCR en tiempo real a partir de muestras citológicas (frotis cervicales) recogidas en un medio líquido SurePath (Becton Dickinson), utilizando un cepillo Cervex Brush Combi (Rovers). El aislamiento de ADN se realizó de forma automática utilizando cuentas magnéticas en un aparato NucliSense EasyMAG (Biomerieux). Se preparó una PCR utilizando una estación de pipeteo automático PIRO (Domier LTF). La amplificación de ADN se llevó a cabo en un aparato Light Cycler 96 (Roche). Conforme a lo mencionado anteriormente, se evaluaron cubreobjetos citológicos de capa fina, preparados utilizando un robot PrepStain (Becton Dickinson), por parte de un equipo experimentado de citomorfólogos y patólogos utilizando cribado asistido por ordenador (sistema Focal Point GS, Becton Dickinson). Los resultados de los exámenes citológicos y de genética molecular se sometieron a un análisis estadístico.

20 Estadística y análisis de los resultados de la eficacia clínica del nuevo ensayo de HR-VPH para detectar lesiones precancerosas y cáncer cervical

[0113] Para determinar la utilidad clínica del nuevo ensayo para HR-VPH, se emplearon los valores del valor predictivo positivo (PPV) y negativo (NPV) en relación con el examen citológico en un medio líquido (SurePath, Becton Dickinson). Así, se determinó la probabilidad de obtener un resultado anormal de un examen citológico en pacientes que presentan un resultado positivo del nuevo ensayo y un resultado normal de un examen citológico con un resultado negativo de la prueba para la presencia de HR-VPH. En caso de que se confirme un valor predictivo negativo elevado del nuevo ensayo, su resultado negativo permitiría la renuncia a un examen citológico, y su resultado positivo podría suponer un criterio para llevarlo a cabo.

[0114] El nivel de correlación entre los resultados del nuevo ensayo hrVPH y los resultados del examen citológico se basó en el valor del coeficiente de correlación tau b de Kendall. Se evaluó el valor predictivo positivo (PPV, la probabilidad de un resultado anormal de un examen citológico en un individuo con un resultado positivo del ensayo para la presencia de HR-VPH) y el valor predictivo negativo (NPV, la probabilidad de un resultado normal de un examen citológico en un individuo con un resultado negativo del ensayo para la presencia de HR-VPH) mediante el análisis ROC. Todos los cálculos estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete de *software* Statistica 10 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, Estados Unidos).

35 Detección de HR-VPH frente a un resultado anormal del examen citológico (mínimo ASCUS)

[0115] Se analizó un total de los resultados de 5000 pares de ensayos hrVPH y exámenes citológicos. El nuevo ensayo produjo 403 (8,1 %) resultados positivos y 4597 (91,9 %) resultados negativos. Los resultados del examen citológico comprendieron 175 (3,5 %) cubreobjetos anormales y 4825 (96,5 %) cubreobjetos normales.

Prueba/resultado	Citología no normal (min. ASCUS)	Citología normal	Total
Nuevo ensayo - resultado positivo	168	235	403
Nuevo ensayo - resultado negativo	7	4590	4597
Total	175	4825	5000

40 En el caso de 235 (58,3 %) pacientes con un resultado positivo del nuevo ensayo, el examen citológico produjo un resultado normal. En el caso de 7 (0,2 %) pacientes con un resultado negativo del nuevo ensayo, el examen citológico produjo un resultado anormal. El coeficiente de correlación tau b de Kendall para el ensayo de presencia de HR-VPH y el resultado de un examen citológico fue $b=0,6152294$.
45 El análisis ROC mostró que el nuevo ensayo se caracterizaba por un valor predictivo positivo (PPV) de 41,7 % y un valor predictivo negativo (NPV) de 99,8 %, en comparación con los resultados de un examen citológico.

Detección de HR-VPH frente a un resultado anormal del examen citológico (H-SIL)

[0116] Se analizó un total de los resultados de 5000 pares de ensayos hrVPH y exámenes citológicos. El nuevo ensayo produjo 403 (8,1 %) resultados positivos y 4597 (91,9 %) resultados negativos. Los resultados del examen

citológico comprendieron 15 (0,3 %) cubreobjetos con lesiones correspondientes a H-SIL y 4985 (99,7 %>) cubreobjetos normales o cubreobjetos con una intensidad inferior a la de H-SIL.

Prueba/resultado	Citología no normal (H-SIL)	Citología normal	Total
Nuevo ensayo - resultado positivo	15	388	403
Resultado negativo del nuevo ensayo	0	4597	4597
Total	15	4985	5000

5 **[0117]** En el caso de 388 (96,3 %) pacientes con un resultado positivo del nuevo ensayo, el examen citológico no reveló lesiones correspondientes a H-SIL. En pacientes con un resultado negativo del nuevo ensayo, el examen citológico no reveló lesiones correspondientes a H-SIL. El coeficiente de correlación tau b de Kendall para el ensayo de presencia de HR-VPH y el resultado de un examen citológico fue $b=0,1852669$.

[0118] El análisis ROC mostró que el nuevo ensayo se caracterizaba por un valor predictivo positivo (PPV) de 3,7 % y un valor predictivo negativo (NPV) de 100,0 %, en comparación con los resultados de un examen citológico.

Detección de VPH 16/18 frente a un resultado anormal del examen citológico (mínimo ASCUS)

10 **[0119]** Se analizó un total de los resultados de 5000 pares de ensayos y exámenes citológicos. El nuevo ensayo produjo 169 (3,4 %) resultados positivos y 4831 (96,6 %) resultados negativos. Los resultados del examen citológico comprendieron 175 (3,5 %) cubreobjetos anormales y 4825 (96,5 %) cubreobjetos normales.

Prueba/resultado	Citología no normal (min. ASCUS)	Citología normal	Total
Nuevo ensayo - resultado positivo	71	98	169
Nuevo ensayo - resultado negativo	104	4727	4831
Total	175	4825	5000

15 **[0120]** En el caso de 98 (58,0 %) pacientes con un resultado positivo del nuevo ensayo, el examen citológico produjo un resultado normal. En el caso de 104 (2,2 %) pacientes con un resultado negativo del nuevo ensayo, el examen citológico produjo un resultado anormal. El coeficiente de correlación tau b de Kendall para el ensayo de presencia de VPH 16/18 y el resultado de un examen citológico fue $b=0,3919416$.

[0121] El análisis ROC mostró que el nuevo ensayo se caracterizaba por un valor predictivo positivo (PPV) de 42,0 % y un valor predictivo negativo (NPV) de 97,8 %, en comparación con los resultados de un examen citológico.

Detección de VPH 16/18 frente a un resultado anormal del examen citológico (H-SIL)

20 **[0122]** Se analizó un total de los resultados de 5000 pares de ensayos y exámenes citológicos. El nuevo ensayo produjo 169 (3,4 %) resultados positivos y 4831 (96,6 %) resultados negativos. Los resultados del examen citológico comprendieron 15 (0,3 %) cubreobjetos con lesiones correspondientes a H-SIL y 4985 (99,1 %) cubreobjetos normales o cubreobjetos con una intensidad inferior a la de H-SIL.

Prueba/resultado	Citología no normal (H-SIL)	Citología normal o H-SIL(-)	Total
Nuevo ensayo - resultado positivo	10	159	169
Nuevo ensayo - resultado negativo	5	4826	4831
Total	15	4985	5000

[0123] En el caso de 159 (94,1 %) pacientes con un resultado positivo del nuevo ensayo, el examen citológico no reveló lesiones correspondientes a H-SIL. En 5 (0,1 %) pacientes con un resultado negativo del nuevo ensayo, el examen citológico reveló lesiones correspondientes a H-SIL. El coeficiente de correlación tau b de Kendall para el ensayo de presencia de HR-VPH y el resultado de un examen citológico fue $b=0,1921027$.

5 [0124] El análisis ROC mostró que el nuevo ensayo se caracterizaba por un valor predictivo positivo (PPV) de 5,9 % y un valor predictivo negativo (NPV) de 99,9 %, en comparación con los resultados de un examen citológico.

Conclusiones

10 [0125] El análisis del valor clínico del nuevo ensayo reveló que se caracterizaba por un valor predictivo negativo óptimo (del 97,8 % al 100 %), comparado con el resultado del examen citológico en un medio líquido. En concreto, se obtuvieron valores NPV altos (100 %) para el resultado negativo para HR-VPH y un 99,9 % para el resultado negativo para VPH 16/18 con respecto a las lesiones precancerosas (H-SIL). El valor inferior del valor predictivo positivo es totalmente entendible debido a que no todas las anomalías citológicas deben ir acompañadas por una infección de VPH activa, especialmente en el grupo de diagnósticos citológicos de los tipos ASC-US y ASC-H. Se espera que se puedan alcanzar coeficientes todavía más favorables del valor predictivo para el ensayo hrVPH en comparación con la citología tradicional, que se caracteriza por una efectividad probada inferior en la detección de células epiteliales cervicales anormales en comparación con los métodos citológicos en un medio líquido (citología de base líquida, LBC).

15 [0126] Los resultados obtenidos indican que en el caso de un resultado negativo del nuevo ensayo, no es necesario un examen citológico. Por consiguiente, el uso del nuevo ensayo podría potencialmente permitir el cese de un examen citológico en una población grande de mujeres VPH-negativas, lo cual permitiría un ahorro significativo.

20 [0127] No obstante, debido al inferior valor predictivo del ensayo, cada caso de resultado positivo debería ser un indicador para realizar una citología. En este contexto, se debe destacar otra ventaja del nuevo ensayo: el hecho de que se lleva a cabo en el mismo material que se utiliza para un examen citológico en un medio líquido. Por consiguiente, en el caso de un resultado positivo del ensayo hrVPH, se puede realizar el examen citológico utilizando el mismo material, sin necesidad de recoger frotis adicionales de la paciente. Esto reduce significativamente el tiempo del procedimiento de diagnóstico y su coste de forma significativa.

25 [0128] Para concluir: en función de los resultados de las investigaciones realizadas, se descubrió que el ensayo hrVPH, de acuerdo con la invención, se caracterizaba por un valor predictivo negativo óptimo (del 97,8 % al 100 %) en comparación con los resultados de un examen citológico en un medio líquido (SurePath), y el uso del nuevo ensayo hrVPH con una alta eficacia clínica puede potencialmente permitir el cese de un examen citológico en una población grande de mujeres HR-VPH-negativas.

30 [0129] La invención posibilita una herramienta de diagnóstico novedosa, que es un ensayo que combina características de exámenes citológicos y de VPH. La implementación del ensayo de acuerdo con la invención en programas de prevención debería incrementar de forma significativa la eficacia del cribado de cáncer cervical y racionalizar los costes del posterior diagnóstico y tratamiento. Además, el uso de un ensayo VPH simple, preferiblemente basado en la técnica de PCR en tiempo real en el material proveniente de la citología en un medio líquido (LBC), permitirá potencialmente una mayor automatización y capacidad del proceso de diagnóstico en laboratorios que participen en programas de prevención. La aplicación del ensayo permitirá determinar el riesgo de cáncer cervical y seleccionar un tratamiento adecuado. Asimismo, el uso novedoso de tecnología LNA, que no había sido utilizada previamente en el diagnóstico de VPH, permite un acceso común al diagnóstico del nivel clínico más alto.

LISTA DE SECUENCIAS

[0130]

45 <110> Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
Podolski, Jacek

<120> Prueba de cribado para detectar la presencia de virus VPH oncogénicos

<130> PZ/2433/AG

<150> P.407864

<151> 2014-04-11

50 <160> 72

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> ADN

55 <213> artificial

<220>
 <223> un cebador para VPH 16 F
 <400> 1
 etiqueta gcacaggaag caaaacaaca 23
 5 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> un cebador para VPH 18 F
 <400> 2
 aggtccacaa tgatgcacaa g 21
 10 <210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> un cebador para VPH 33/33n F
 <400> 3
 cagaagatga g gatgaaaca gcag 24
 15 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> un cebador para VPH 31 F
 <400> 4
 gaggaacatg cagaggctgt 20
 20 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> un cebador para VPH 35 F
 <400> 5
 atgcacagga ggagcaaaca 20
 25 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> un cebador para VPH 39 F
 <400> 6
 gtgagacagc acaggtactt ttac 24
 30 <210> 7
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> un cebador para VPH 45 F
 <400> 7
 ccatgcgag gaagttcag 19
 35

ES 2 684 746 T3

<210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> un cebador para VPH 51 F
 <400> 8
 acaaagaggc tgtgcatcag 20
 10 <210> 9
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> un cebador para VPH 52 F
 15 <400> 9
 gaaggggagg atgattaca tgc 23
 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> un cebador para VPH 56/66 F
 <400> 10
 gcaagtacaa acagcacatg c 21
 25 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 30 <223> un cebador para VPH 58 F
 <400> 11
 agcccgagcg ttgttaatg 20
 <210> 12
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> un cebador para VPH 59 F
 <400> 12
 40 ggccttggtt aatgtgcagg aag 23
 <210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial
 45 <220>
 <223> un cebador para VPH 68 F
 <400> 13
 caaacaggtg acacagtctc ag 22
 <210> 14
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> un cebador para VPH 16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66 R

<400> 14
 gtattgccat acccgctgc t 21
 <210> 15
 <211> 22
 5 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> un cebador para VPH 18/45 R
 <400> 15
 10 aacagccata gccactatct ga 22
 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> un cebador para VPH 51 R
 <400> 16
 ctgtccggat aactgtccag t 21
 <210> 17
 20 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> un cebador para VPH 59 R
 25 <400> 17
 tgtctggcac tttaktaac ctcc 24
 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> artificial
 <220>
 <223> un cebador para VPH 68 R
 <400> 18
 tcctgtaatg gcgacttgc t 21
 35 <210> 19
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 40 <223> un cebador para VPH 16 F HEX
 <400> 19
 taatggatgg tttatgtag aggct 25
 <210> 20
 <211> 24
 45 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> un cebador para VPH 16 R HEX
 <400> 20
 50 ctgcctgtgt taaataatca ttat 24
 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> un cebador para VPH 18 F HEX
 <400> 21
 ggctggttt atgtacaagc t 21
 5 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> un cebador para VPH 18 R HEX
 <400> 22
 cctgttcaca aaatgtcct t 21
 10 <210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> un cebador para HBE1 IC F
 <400> 23
 gagaactca agtgagtc aggt 24
 20 <210> 24
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> un cebador para HBE1 IC R
 <400> 24
 gaagtctgct gttctaacaat caag 24
 25 <210> 25
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> una secuencia de HR-VPH
 <400> 25
 acttctgtt 10
 30 <210> 26
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> una secuencia de VPH 33n
 <400> 26
 acttctgctt 10
 40 <210> 27
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> una secuencia de VPH 16/18
 <400> 27
 atatcwgatg acgag 15
 50

<210> 28
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> una secuencia de HBE1
 <400> 28
 tgacattaat tgaagctcat aatcttattg 30
 10 <210> 29
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> una sonda para HR-VPH
 15 <220>
 <221> misc-feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-6FAM
 20 <220>
 <221> misc-feature
 <222> (10)..(10)
 <223> BHQ-1-3'
 <400> 29
 actttcgttt 10
 25 <210> 30
 <400> 30
 000
 <210> 31
 <211> 15
 30 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> una sonda para 16/18
 35 <220>
 <221> misc-feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-HEX
 <220>
 <221> misc-feature
 40 <222> (6) .. (6)
 <223> "W" significa un cambio de base A/T.
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 45 <223> BHQ-1-3'
 <400> 31
 atatcwgatg acgag 15
 <210> 32
 <211> 30
 50 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> una sonda para IC

ES 2 684 746 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-ROX
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> BHQ-2-3'
 10 <400> 32
 tgacattaat tgaagctcat aatcttattg 30
 <210> 33
 <211> 180
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> región de genoma de VPH16
 <400> 33
 gcacaggaag caaaacaaca tagagatgca gtacaggttc taaaacgaaa gtatttgggt 60
 agtccactta gtgatattag tggatgtgta gacaataata ttagtcctag attaaaagct 120
 atatgtatag aaaaacaaag tagagctgca aaaaggagat tatttgaaag cgaagacagc 180
 20 <210> 34
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> región de consenso de genoma de VPH objetivo de sonda pan-VPH
 25 <400> 34
 aaacgaaagt 10
 <210> 35
 <211> 240
 <212> ADN
 30 <213> artificial
 <220>
 <223> región de genoma de VPH 33n
 <400> 35
 cattgttttaa tatacaggaa ggggaggatg acttaaatgc tgtgtgtgca ctaaagcgaa 60
 agtttgccgc atgttcacaa agtgctgcgg aggacgttgt tgatcgtgct gcaaaccctg 120
 gtagaacgtc tattaataaa aataaagaat gcacatacag aaaacgaaaa atagatgagc 180
 tagaagacag cggatatggc aatactgaag tggaaactca gcagatggta caacaggtag 240
 35 <210> 36
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> región de genoma de VPH 33n objetivo de sonda 33n
 40 <400> 36
 aagcgaaagt 10
 <210> 37
 <211> 240
 <212> ADN
 45 <213> artificial

ES 2 684 746 T3

<220>
 <223> región de genoma de VPH 16

<400> 37
 acgggatgta atggatggtt ttatgtagag gctgtagtgg aaaaaaaaaac aggggatgct 60
 atatcagatg acgagaacga aatgacagt gatacaggtg aagatttggg agattttata 120
 gtaaatagata atgattattht aacacaggca gaaacagaga cagcacatgc gttgthtact 180
 5 gcacaggaag caaaacaaca tagagatgca gtacaggttc taaaacgaaa gtatttgggt 240

<210> 38
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> sonda VPH 16

<400> 38
 atatcagatg acgag 15

15 <210> 39
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial

20 <220>
 <223> sonda VPH 18

<400> 39
 atatctgatg acgag 15

25 <210> 40
 <211> 420
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Región de genoma de VPH 18

<400> 40
 gcagtaagca acaatggctg atccagaagg tacagacggg gagggcacgg ggtgtaacgg 60
 ctggtthttat gtacaagcta ttgtagacaa aaaaacagga gatgtaatat ctgatgacga 120
 ggacgaaaat gcaacagaca cagggtcggg tatggtagat thtattgata cacaaggaac 180
 atthtgtgaa caggcagagc tagagacagc acaggcattg thtcatgcgc aggaggtcca 240
 caatgatgca caagtgttgc atgtthttaa acgaaagtht gcaggaggca gcaaagaaaa 300
 cagtccatta ggggagcggc tggaggtgga tacagagtha agtccacggt tacaacaaat 360
 30 atcattaaat agtgggcaaa aaaaggcaaa aaggcggctg thcacaatat cagatagtgg 420

<210> 41
 <211> 240
 <212> ADN
 <213> artificial

35 <220>
 <223> Región de genoma de VPH 16

<400> 41
 gcacaggaag caaaacaaca tagagatgca gtacaggttc taaaacgaaa gtatttgggt 60

ES 2 684 746 T3

	agtcactta gtgatattag tggatgtgta gacaataata ttagtcctag attaaaagct	120
	atatgtatag aaaaacaaag tagagctgca aaaaggagat tatttgaaag cgaagacagc	180
	gggtatggca atactgaagt ggaaactcag cagatgttac aggtagaagg gcgccatgag	240
5	<210> 42 <211> 10 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Secuencia de sonda pan-VPH complementaria inversa, que se corresponde con la región de consenso objetivo de la sonda pan-VPH	
10	<400> 42 aaacgaaagt 10	
	<210> 43 <211> 194 <212> ADN <213> artificial	
15	<220> <223> Ejemplo de producto de PCR obtenido a partir de cebadores VPH 16 F y cebador inverso común	
	<400> 43 gcacaggaag caaaacaaca tagagatgca gtacagggtc taaaacgaaa gtatttgggt	60
	agtcactta gtgatattag tggatgtgta gacaataata ttagtcctag attaaaagct	120
	atatgtatag aaaaacaaag tagagctgca aaaaggagat tatttgaaag cgaagacagc	180
	gggtatggca atac	194
20	<210> 44 <211> 1950 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Secuencia génica de nucleótidos 865-2814 de VPH 16	
25	<400> 44 atggctgac ctgcaggtag caatggggaa gagggtagcg gatgtaatgg atggttttat	60
	gtagaggctg tagtggaana aaaaacaggg gatgctatat cagatgacga gaacgaaaat	120
	gacagtgata caggtgaaga tttggtagat tttatagtaa atgataatga ttatttaaca	180
	caggcagaaa cagagacagc acatgcggtt tttactgcac aggaagcaaa acaacataga	240
	gatgcagtac aggttctaaa acgaaagtat ttgggtagtc cacttagtga tattagtgga	300
	tgtgtagaca ataatttag tcctagatta aaagctatat gtatagaaaa acaaagtaga	360
	gctgcaaaaa ggagattatt tgaaagcgaa gacagcgggt atggcaatac tgaagtggaa	420
	actcagcaga tgttacaggt agaagggcgc catgagactg aaacaccatg tagtcagtat	480

ES 2 684 746 T3

agtgggtggaa gtgggggtgg ttgcagtcag tacagtagtg gaagtggggg agagggtgtt 540
 agtgaaagac aactatgatg ccaaacacca cttacaaata ttttaaatgt actaaaaact 600
 agtaatgcaa aggcagcaat gttagcaaaa tttaaagagt tatacggggg gagtttttca 660
 gaattagtaa gaccatttaa aagtaataaa tcaacgtgtt gcgattgggtg tattgctgca 720
 tttggactta caccagtat agctgacagt ataaaaacac tattacaaca atattgttta 780
 tttttacaca ttcaaagttt agcatgttca tggggaatgg ttgtgttact attagtaaga 840
 tataaatgtg gaaaaaatag agaacaatt gaaaaattgc tgtctaaact attatgtgtg 900
 tctccaatgt gtatgatgat agagcctcca aaattgctga gtacagcagc agcattatat 960
 tgggtataaaa caggtatatac aaatattagt gaagtgtatg gagacacgcc agaattggata 1020
 caaagacaaa cagtattaca acatagtttt aatgattgta catttgaatt atcacagatg 1080
 gtacaatggg cctacgataa tgacatagta gacgatagtg aaattgcata taaatatgca 1140
 caattggcag aactaatag taatgcaagt gcctttctaa aaagtaattc acaggcaaaa 1200
 attgtaaagg attgtgcaac aatgtgtaga cattataaac gagcagaaaa aaaacaaatg 1260
 agtatgagtc aatggataaa atatagatgt gatagggtag atgatggagg tgattggaag 1320
 caaattgtta tgtttttaag gtatcaaggt gtagagtta tgtcattttt aactgcatta 1380
 aaaagatttt tgcaaggcat acctaaaaaa aattgcatat tactatatgg tgcagctaac 1440
 acaggtaaatt cattatttgg tatgagttta atgaaatttc tgcaagggtc tgtaatatgt 1500
 tttgtaaat ctaaaagcca tttttggta caaccattag cagatgcaa aataggatg 1560
 ttagatgatg ctacagtgcc ctgttggaa tacatagatg acaatttaag aaatgcattg 1620
 gatggaaatt tagtttctat ggatgtaaag catagaccat tggtagaact aaaatgccct 1680
 ccattattaa ttacatctaa cattaatgct ggtacagatt ctaggtggcc ttatttacct 1740
 aatagattgg tgggtgttac atttccctaat gagtttccat ttgacgaaaa cggaaatcca 1800
 gtgtatgagc ttaatgataa gaactggaaa tcctttttct caaggacgtg gtccagatta 1860
 agtttgcacg aggcagagga caaggaaaac gatggagact ctttgccaac gtttaaatgt 1920
 gtgtcaggac aaaatactaa cacattatga 1950

- <210> 45
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> artificial
- <220>
- <223> región del gen E1 de VPH 16 objetivo del cebador inverso VPH 16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R
- 5
- <400> 45
- 10 agacagcggg tatggcaata c 21
- <210> 46
- <211> 1974
- <212> ADN
- <213> artificial
- 15
- <220>
- <223> secuencia del gen E1 de los nucleótidos 914 - 2887 de VPH 18

ES 2 684 746 T3

<400> 46
atggctgac cagaaggtac agacggggag ggcacggggt gtaacggctg gttttatgta 60
caagctattg tagacaaaaa aacaggagat gtaatatctg atgacgagga cgaaaatgca 120
acagacacag ggtcggatat ggtagathtt attgatacac aaggaacatt ttgcgaacag 180
gcagagctag agacagcaca ggcattgttt catgcgacag aggtccacaa tgatgcacaa 240
gtgttgcatg ttttaaacg aaagtttgca ggaggcagca aggaaaacag tccattaggg 300
gagcggctgg aggtggatac agagttaagt ccacggttac acaaatatc attaaatagt 360
gggcaaaaaa aggcaaaaag gcggctgttc acaatatcag atagtggcta tggctgttct 420
gaagtggaag caacacagat tcaggttaatt acaaatggcg aacagggcgg caatgtatgt 480
agtggcggca gtacagaggc tatagacaat gggggcacag agggcaacaa cagcagtgt 540
gacggtacaa gtgacactag caatatagaa aatgtaaadc cacaatgtac catagcacia 600
ttaaagact tgttaaaagt aaacaataaa caaggagcaa tgttagcagt atttaaagac 660
acatatgggc tatcatttac agatttagtt agaaatttta aaagtataa aaccacgtgt 720
acagattggg ttacagctat atttgagta aocccaacia tagcagaagg atttaaaaca 780
ctaatacagc catttatatt atatgccat attcaatgtc ttgactgtaa atggggagta 840
ttaatattag ccctgttgcg ttacaaatgt ggtaaaagta gactaacagt tgctaaaggt 900
ttaagtacgt tgttacacgt acctgaaact tgtatgttaa ttcaaccacc aaaattgca 960
agtagtggtg cagcactgta ttggtataga acaggaatat caaatattag tgaagtaatg 1020
ggagacacac ctgagtggat acaagactt actattatac aacatggaat agatgatagc 1080
aattttgatt tgtcagaaat ggtacaatgg gcatttgata atgagctgac agatgaaagc 1140
gatatggcat ttgaatatgc cttattagca gacagcaaca gcaatgcggc tgccttttta 1200
aaaagcaatt gccaaagctaa atatttaaaa gattgtgcca caatgtgcaa acattatag 1260
cgagccaaa aacgacaaat gaatatgtca cagtggatac gatttagatg tttaaaaata 1320
gatgaagggg gagattggag accaatagtg caatttttgc gataccaaca aatagagttt 1380
ataacatttt taggagcctt aaaatcattt ttaaaaggaa ctcccaaaaa aaattgttta 1440
gtattctgtg gaccagcaa tacaggaaaa tcatattttg gaatgagttt tatacacttt 1500
atacaaggag cagtaatatc atttgtaaat tctactagtc atttttggtt ggaaccgtta 1560
acagatacca aggtggccat gttagatgat gcaacaacca cgtgttgac atactttgat 1620
acctatatga gaaatgcttt agatggcaat ccataagta ttgatagaaa gcacaaacca 1680
ttaatacaac taaaatgtcc tccaatacta ctaaccacia atatacatcc agcaaggat 1740
aacagatggc catatttaga aagtagaata acagtatttg aatttccaaa tgcatttcca 1800
tttgataaaa atggcaatcc agtatatgaa ataatgaca aaaattggaa atgttttttt 1860
gaaaggacat ggtccagatt agatttgcac gaggaagagg aagatgcaga caccgaagga 1920
aacctttcg gaacgttta gtgcgttgca ggacaaaatc atagaccact atga 1974

5

<210> 47
<211> 22
<212> ADN
<213> artificial

ES 2 684 746 T3

<220>
 <223> Región del genoma E1 de VPH18 objetivo del cebador inverso VPH 18/45 R

<400> 47
 tcagatagtg gctatggctg tt 22

5 <210> 48
 <211> 2002
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Genoma de VPH 33 que comprende la secuencia del gen E1 de los nucleótidos 879 - 2813

<400> 48
 atggccgatc ctgaaggtac aaatggggct gggatggggt gtactggttg gtttgaggta 60
 gaagcagtca tagagagaag aacaggagat aatatttcag aagatgagga tgaaacagca 120
 gatgacagtg gcacggattt actagagttt atagatgatt ctatggaaa tagtatacag 180
 gcagacacag aggcagcccg ggcattgttt aatatacagg aaggggagga tgacttaaata 240
 gctgtgtgtg cactaaagcg aaagtttgcc gcatgttcac aaagtgtgc ggaggacggt 300
 gttgatcgtg ctgcaaaccg gtgtagaacg tctattaata aaaataaaga atgcacatac 360
 agaaaacgaa aaatagatga gctagaagac agcggatatg gcaatactga agtggaact 420
 cagcagatgg tacaacaggt agaaagtcaa aatggcgaca caaacttaa tgacttagaa 480
 tctagtgggg tgggggatga ttcagaagta agctgtgaga caaatgtaga tagctgtgaa 540
 aatggtacat tgcaggaaat tagtaatggt ctacatagta gtaatacaaa agcaaatata 600
 ttatataaat ttaaagaggc ctatggaata agttttatgg aattagtaag accatttaaa 660
 agtgataaaa caagctgtac agattggtgt ataacaggat atggaattag tccatcagta 720
 gcagaaagtt taaaagtatt aattaaacag catagtttgt atactcattt acaatgttta 780
 acttgcgata gaggaataat aatattattg ttaattagat ttaggtgtag caaaaacag 840

ES 2 684 746 T3

	ttaacagtag caaaactaat gagtaattta ttatcaatac ctgaaacatg tatggttata	900
	gagccaccaa agttacggag ccaaacatgt gcattgtatt ggtttagaac agcaatgtca	960
	aacattagtg atgtacaagg tacaacacct gaatggatag atagactaac tgttttacia	1020
	catagcttta atgataaatat atttgattta agtgaaatgg tacagtgggc atacgataac	1080
	gagttaacgg acgatagtga cattgcatat tattatgcac aacttgcaga ttcaaatagt	1140
	aatgctgctg cttttttaa aagtaactca caagcaaaaa tagtaaagga ctgtggaata	1200
	atgtgtagac attataaaaa agcagaaaaa cgtaaaatgt caataggaca atggatacaa	1260
	agtagatgtg aaaaaacaaa tgatggagga aattggagac caatagtaca gttgttaaga	1320
	tatcaaaaca ttgaatttac agcattttta ggtgcattta aaaagttttt aaaaggtata	1380
	ccaaaaaaaa gctgtatgct aatttgtgga ccagcaaata caggaaagtc atattttgga	1440
	atgagtttaa tacagttttt aaaaggggtg gttatatcat gtgtaaattc taaaagtcac	1500
	ttttggttgc agccattatc agatgcaaaa ataggaatga tagatgatgt aacgccaata	1560
	agttggacat atatagatga ttacatgaga aatgcgtag atggaaatga aatttcaata	1620
	gatgtgaaac atagggcatt agtgcaatta aaatgtccac cactgcttct tacctcaaat	1680
	acaaatgcag gcacagactc tagatggcca tatttacata gtagattaac agtatttgaa	1740
	tttaaaaatc cattccatt tgatgaaaat ggtaaccag tgatgtaat aatgatgaa	1800
	aattggaat ctttttctc aaggacgtgg tgcaaattag atttaataga ggaagaggac	1860
	aaggaaaacc atggaggaaa ttcagcacg tttaaatgca gtgcaggaga aaatactaga	1920
	tctttacgaa gctgataaaa ctgatttacc atcaciaaatt gaacattgga aactgatagc	1980
	catggagtgt gctttatttt at	2002
	<210> 49	
	<211> 21	
5	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de VPH 39 objetivo del cebador inverso VPH16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R	
	<400> 49	
10	agacagcggga tatggcaata c 21	
	<210> 50	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
15	<220>	
	<223> Complemento inverso de SEQ ID N.º 49	
	<400> 50	
	gtattgcat atccgctgc t 21	
	<210> 51	
20	<211> 1891	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
25	<223> Secuencia del genoma de VPH31 que comprende los nucleótidos 862 - 2751 de la secuencia génica E1	

ES 2 684 746 T3

<400> 51
aatggctgat ccagcaggtta cagatgggga ggggacggga tgcaatggtt ggttttatgt 60
agaagcagta attgacagac agacagggga caacatttca gacgacgaaa atgaagacag 120
tagtgatact ggggaggata tggttgactt tattgacaat tgtaatgtat acaacaatca 180
ggcagaagca gagacagcac aggcattggt tcatgcacag gaagcggagg aacatgcaga 240
ggctgtgcag gttctaaaac gaaagtatgt aggtatgcct ttaagtata ttagtagttg 300
tgtggattat aatattagtc cacggttaa agctatatgc atagaaaata acagtaaac 360
agcaaacga agactttttg aacttccaga cagcgggtat ggcaatactg aagtggaagc 420
gcagcagatg gtacaggtag aggagcaaca aacaacatta agttgtaatg gtagtgacgg 480
gacacatagt gaacgagaca atgaaactcc aacacgtaat atattgcaag tgttaaaaac 540
tagcaatggt aaagctgcta tgttaggtaa atttaaagaa ttatatggtg taagttttat 600
ggaactaatt aggcatttc aaagcaataa aagcacatgt gctgattggt gtgtagctgc 660
gtttggagtt acaggtacag ttgcagaagg atttaaaacc ctattgcaac catattgttt 720
gtattgccat ttacaaagt tagcatgttc ctggggcatg gttatgttaa tgcttgtaag 780
atttaaagt gcaaaaaata gaataacaat tgaaaaatta ttagaaaagt tattgtgtat 840
atctacaaat tgtatgttaa ttcagccacc caaattacgt agtacagctg cagcattata 900
ttggtacaga acaggaatgt caaacattag tgatgtatat ggtgaaacac cagaatggat 960
agaaagacaa acagtattac agcatagttt taatgacaca acatttgatt tgtcccaaat 1020
ggtacaatgg gcatatgaca atgatgttat ggatgatagt gaaattgcct atagatatgc 1080
acaattagct gacagtgata gtaatgcatg tgcattttta aaaagtaatt cgcaggcaaa 1140
aatagttaaa gattgtggaa caatgtgtag acattataaa cgagcagaaa aacgacaaat 1200
gtctatggga cagtggatta aaagtagatg tgacaaagt agtgacgaag gtgactggag 1260
ggacatagta aagttttta gatatcaaca aatagaatth gtgtcatttt tatctgcatt 1320
aaagctgttt ttaaaaggag tgccaaagaa aaactgtatt ttaatacatg gtgcaccta 1380
tacaggtaaa tcatattttg gaatgagcct tatgagcctc ttacaaggat gtataatatac 1440
atagcaaat tcaaaaagtc atttttggtt acaaccactg gctgatgcta aaataggcat 1500
gttagatgat gctacaacgc catgttggca ttatatagac aattacctac gaaatgcact 1560
agatggcaac cctgtatcta tagatgtaaa gcataaagct ttaatgcagt taaaatgtcc 1620
tcctttattg attacatcta atataaatgc aggtaggat gacagatggc catacctaca 1680
tagcagacta gtggttttta catttccaaa tccatttcca tttgacaaaa acggaatcc 1740
agtatatgaa ttaagtata aaaactggaa atcctttttc tcaaggacgt ggtgcagatt 1800
aaatttgcac gaggaagagg acaaagaaaa cgatggagac tctttctcaa cgtttaaattg 1860
tgtgtcagga caaaatatta gaacattatg a 1891

5

<210> 52
<211> 1914
<212> ADN
<213> artificial

ES 2 684 746 T3

<220>

<223> Secuencia del gen E1 de los nucleótidos 868 – 2781 de VPH35

<400> 52

atggctgac	ctgcaggtac	agatgaaggg	gaggggacgg	gatgtaatgg	atggtttttt	60
gtagaagcag	tagttagtag	acgtacgggg	gatccagtgt	cagaggacga	aatgaagat	120
gactgtgaca	gggggagga	tatggtggac	tttataaatg	atacagatat	attaacata	180
caggcagaaa	cagagacagc	acaagcatta	tttcatgcac	aggaggagca	aacacacaaa	240
gaggctgtac	aggtcctaaa	acgaaagtat	gctagtagtc	cacttagcag	cgtgagctta	300
tgtgttaata	ataacataag	tccacgttta	aaagctat	gcattgaaa	taaaaataca	360
gcagcaaagc	gacgattatt	tgaactacca	gacagcggtt	atggcaattc	tgaagtggaa	420
atacagcaga	tacaacaggt	agaggggcat	gatacagttg	aacaatgtag	tatgggcagt	480
gggatagta	taacctctag	tagcgatgaa	agacatgaag	agactccaac	gcgagacata	540
atacaaatac	taaaatgtag	taatgcaaac	gcagctatgt	tggctaaatt	taaagacctt	600
tttgggtatta	gttttacaga	acttattaga	ccatttaaga	gtgataaatc	cacatgtaca	660
gattggtgtg	tggccgcatt	tggaatagcc	ccaagtgtgg	cggaaagttt	aaaaacatta	720
attaaccat	attgtttata	tgtacatata	caatgtttat	cgtgttcatg	gggtatggta	780
attctagcat	tattacgatt	taaagtgtca	aaaaacagaa	caacaattga	aaaactatta	840
tcaaaattgc	tatgtat	agctgcaagt	atgctaatac	aaccaccaa	attacgtagt	900
acccagctg	cgttatattg	gtttaaaca	gcaatgtcaa	atattagtga	ggttgatgga	960
gaaacaccag	aatggattca	aagacaaaca	gtattacagc	atagtttta	tgatgcaata	1020
tttgacctat	ctgaaatggt	acaatgggca	tatgacaatg	attttataga	tgatagtgat	1080
atagcatata	aatatgcaca	attggcagaa	actaatagta	atgcatgtgc	tttttaaaa	1140
agtaattcgc	aagctaaaat	tgtaaaagat	tgtgcaacaa	tgtgtagaca	ttataaacga	1200
gctgaaaaaa	gagaaatgac	aatgtcacag	tggattaaaa	ggcgatgtga	aaaggtggac	1260
gatgacggtg	actggagggg	catagtacga	tttttaagat	atcaacaagt	agattttctg	1320
gcatttttat	ctgcactaaa	aaatttttta	catgggtgtgc	ctaaaaaaaa	ttgcatactt	1380
atatatggag	caccaaacac	aggtaaatca	ttatgtggaa	tgagtcta	gcatttctta	1440
caaggagcta	ttatatccta	tgtaaattct	aaaagccatt	tttggttgca	gccattatat	1500
gatgccaaaa	tagctatggt	agatgatgct	acatcgccat	gttgggcata	tatagaccaa	1560
tatttaagaa	atgcactaga	tggaaatcct	atttcattag	atgtaaagca	taaagcatta	1620
gtgcaattaa	aatgcccacc	tttacttatt	acatcaaata	taaagtcagg	caaagatgac	1680
aggtggccat	acttacatag	cagggtagtg	gtctttacat	ttcacaatga	attcccattt	1740
gataaaaatg	gaaaccagct	gtatgggctt	aatgataaaa	actggaatc	ctttttctca	1800
aggacgtggt	gcagattaaa	tttgcacgag	gaagaggaca	aagaaaatga	tggagacgct	1860
ttcccagcgt	ttaagtgtgt	gtcaggacaa	aatactagaa	cattacgaga	ctga	1914

<210> 53

<211> 21

ES 2 684 746 T3

<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Región de la secuencia de VPH53 objetivo del cebador inverso
5 VPH16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R

<400> 53
agacagcggg tatggcaatt c 21

<210> 54
10 <211> 21
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Complemento inverso de SEQ ID N.º 53

<400> 54
15 gaattgccat aaccgctgtc a 21

<210> 55
<211> 1943
<212> ADN
<213> artificial

20 <220>
<223> Secuencia del gen E1 de los nucleótidos 928 – 2871 de VPH 39

<400> 55
tggccaatcg tgaaggtaca gacggggatg ggtcgggatg taacggatgg tttctagtagtac 60

ES 2 684 746 T3

aggcaatagt agataaaca acagggcaca cagtgtcggg ggatgaggat gaaaatgcaa 120
 cagatacagg ttcagacttg gcagacttta ttgatgattc cacagatatt tgtgtacagg 180
 cagagcgtga gacagcacag gtacttttac atatgcaaga ggcccaaagg gatgcacaag 240
 cagtgcgtgc cttaaaacga aagtatacag acagcagtgg cgacactaga ccgtatggaa 300
 aaaaagtagg caggaatacc aggggaacac tacaggaaat ttcattaaat gtaagcagta 360
 cgcaggcaac acaaacggtg tattccgtgc cagacagcgg atatggcaat atggaagtgg 420
 aaacagctga agtggaggag gtaactgtag caactaatac aaatggggat gctgaagggg 480
 aacatggcgg cagtgtacgg gaggagtgca gtagtgtgga tagtgctata gatagtgaaa 540
 accaggatcc caaatctcca actgcacaaa ttaaattatt gttacaatcc aataacaaaa 600
 aggctgcaat gctaacacaa tttaaagaaa catatggact atcctttact gacctggtac 660
 gtacgtttaa aagtgataaa acaacatgta cagactgggt ggcagccata tttggagtac 720
 atccaactat tgcagaagga tttaaaacat taatcaacaa atatgcctta tatacacata 780
 tacaagctt agacacaaaa caaggagtac taattttaat gctaataaga tatacatgtg 840
 gaaaaaatag gttactgta gaaagggat taagtacatt gttacatgtt ccagaaagtt 900
 gtatgcttct ggagcctcct aaactgcgca gccctgtagc agcactatat tggtatogca 960
 caggatatat caatattagt gtggtaacag gggatacggc agaatggata caacgattaa 1020
 ctgttataca acatggaata gatgatagtg tatttgacct atcggacatg gtacaatggg 1080
 catttgacaa tgaatatact gatgaaagtg acatagcatt taattatgca atgttagcag 1140
 attgtaacag taatgctgca gcctttttaa aaagtaactg ccaggcaaaa tatgtaaaag 1200
 attgtgcaac aatgtgtaaa cattacaagc gagcacaaaa aaggcaaatg tccatgtctc 1260
 aatggataaa attttagtgt agtaaagtgt atgaaggcgg ggactggaga cccatagtac 1320
 aattcctaag atatcaagga atagaattta tacccttttt atgtgcatta aaggaatfff 1380
 taaaggtac tcccaaaaa aactgtatag ttatatatgg acctgogaat acaggaaagt 1440
 cacatfffft tatgagcctt atgcattfff tacagggcac agttatttca tatgtaaact 1500
 ccaccagcca cttttggcta gaaccacttg cagatgcaaa actagcaatg ttagatgatg 1560
 caaccggtac ctgctgtgca tatttcgata attatatgag aaatgcatta gatgggatg 1620
 caataagttt agataggaaa tataaaagtt tactacaaat gaaatgtcca ccattattaa 1680
 taacctcaa taccaatcct gtggaagacg ataggtggcc atatttacgt agtaggotaa 1740
 cagtgtttaa atttccta atgcattccat ttgacaaaa caggaatcca gtgtacacaa 1800
 tcaatgataa aaactggaaa tgtttttttg aaaagacttg gtgcagatta gacttgacgc 1860
 aggacgagga tgaaggagac aatgatgaaa acactttcac aacgtttaaa tgtgttacag 1920
 gacaaaatac tagaatacta tga 1943

<210> 56

<211> 1931

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia génica E1 de los nucleótidos 914 - 2845 de VPH 45

5

ES 2 684 746 T3

<400> 56
 tggcgggatcc agaaggtacc gacggggagg gaacggggtg taatggctgg ttctttgtag 60
 aaacaattgt agagaaaaa acaggggatg taatatcaga tgatgaggat gaaactgcaa 120
 cagatacagg gtcggatatg gtagatttta ttgacacaca attatccatt tgtgaacagg 180
 cagagcaaga gacagcacag gcattgttcc atgcgcagga agttcagaat gatgcacagg 240
 tgttgcatct tttaaaacga aagtttgtag gaggcagcaa ggaaaacagt ccattagggg 300
 agcagctaag tgtggatagc gatctaagtc cacggttaca agaaatttca ttaaatagtg 360
 ggcacaaaaa agcaaaaacga cggttgttta caatatcaga tagtggctat ggctgttctg 420
 aagtggaagc tgcagagact caggtaactg taaacactaa tgcggaaaat ggcggcagtg 480
 tacatagtac acaaagtagt ggtggggata gtagtgacaa tgcagaaaat gtagatccgc 540
 attgcagtat tacagaacta aaggagctat tacaagcaag taacaaaaag gctgcaatgc 600
 tggcagttat taaagacata tatgggctgt catttacgga tttggttaga aattttaaaa 660
 gtgataaac aacatgtaca gattgggtaa tggctatatt tggagttaat ccaacggtag 720
 cagaaggctt taaaacatta attaaaccag caacgttata cgcccatatc caatgtttag 780
 attgtaaatg gggagtatta atattagctt tattaagata taaatgtggc aaaaatagac 840
 taactgttgc aaaaggctta agcacattgt tgcacgtacc tgaaacatgt atgttaattg 900
 aaccaccaa attgcgaagt agtgttgtag cattatactg gtatagaaca ggtatatcca 960
 atattagtga agtaagtgga gacacacctg agtggataca aagactgaca attattcaac 1020
 atggtattga cgatagtaat tttgatttgt cagacatggt gcaatgggca tttgataatg 1080
 accttacaga tgaaagtgat atggcatttc aatatgccca attagcagac tgcaacagta 1140
 atgcagctgc atttttaaaa agtaactgcc aagccaaata tttaaaagat tgtgctgtaa 1200
 tgtgtagaca ttataaaaga gcacaaaaac gccaaatgaa tatgtctcaa tggattaaat 1260
 atagatgttc caaaatagat gaagtgggg attggagacc catagtacaa ttcttaagat 1320
 atcagggagt agaatttatt agctttttaa gggcactaaa ggaatttctt aaaggaacac 1380
 caaaaaaaaa ttgtatactg ttatatggac ctgcaaatac aggaaaatcg tattttggaa 1440
 tgagttttat acatttccta caagtgcaa taatatcatt tgtaaattca aacagccatt 1500
 tttggttaga accgtagca gatactaagg tagccatggt ggatgatgcc acacacacgt 1560
 gttggacata ttttgataat tatatgagaa atgcattaga tggtaatoct ataagtatag 1620
 acagaaagca taaaccatta ttacagctaa aatgtcctcc aatcctatta acatccaata 1680
 ttgatccagc aaaagataat aaatggccat atttagaaag tagggtgacg gtatttacat 1740
 ttccacatgc atttccattt gataaaaatg gtaatccagt atatgaaata aatgataaaa 1800
 attggaaatg ttttttgaa aggacatggt ccagattaga tttgcacgag gacgatgaag 1860
 atgcagacac cgaaggaatc cctttcgaa cgtttaagtg cgttacagga caaaatacta 1920
 gaccactatg a 1931

5

<210> 57
 <211> 1800
 <212> ADN
 <213> artificial

ES 2 684 746 T3

<220>

<223> Nucleótidos 841 – 2640 de VPH 51 que comprenden la secuencia génica E1

<400> 57

ttgcccggtg	tgtgcgaaca	actagcaacg	gcgatggact	gtgaaggtag	agaggatgag	60
ggggcggggt	gtaatgggtg	gttttttggt	gaagcaatag	tagaaaaaa	aacaggagat	120
aatgtttcgg	atgatgagga	tgaaaatgca	gatgatacag	gatctgattt	aataaacttt	180
atagatagtg	aaactagtat	ttgcagtcag	gcggaacagg	agacagcacg	ggcgttgttt	240
caggccaag	aattacaggc	aaacaaagag	gctgtgcatc	agttaaacg	aaagtttcta	300
gtcagcccg	gaagcagccc	attaggagac	attacaaatc	aaaacaacac	acacagccat	360
agtcaggcaa	acgagtcaca	agttaaaagg	agattactgg	acagttatcc	ggacagcggg	420
tatggcaata	cacaagtgga	aactgtggaa	gcaacgttgc	aggtagatgg	gcaacatggc	480
ggttcacaga	acagtgtgtg	tagtagcggg	gggggcagtg	ttatggatgt	ggaacaaca	540
gaaagctgtg	caaatgtaga	actaaacagt	atatgtgaag	tattaaaaag	cagtaatgca	600
aaagcaacgt	taatggcaaa	atttaaagag	ttgtatggta	ttagttataa	tgagttggta	660
cgggtgttta	aaagtataa	aacatgttgt	atagattggg	tttgtgcatt	gtttggcggt	720
tccccaatgg	tagcagaaaa	tttaaaaaca	ctaattaagc	cattttgcat	gtactacat	780
atacaatgtt	tatcatgtga	ttggggcacc	attgtattaa	tgctaattag	gttttcatgt	840
gcaaaaaaca	gaacaacaat	tgctaagtgt	ttaagtagat	tagtaaatat	cccacaatca	900
caaatgttta	tagaaccacc	aaaattacgt	agtacacctg	tggcattata	tttttataga	960
acaggcatat	caaacattag	caatacatat	ggagagacac	ctgaatggat	tacacgacaa	1020
acgcaactac	aacatagttt	tgaggatagt	acctttgaat	tatcacaat	ggtgcaatgg	1080
gcatttgacc	atgaagtatt	agatgatagt	gaaatagcat	ttcattatgc	acaattagca	1140
gatatagata	gtaatgctgc	agcgttttta	aagagtaatt	gccaagcaaa	atatgtaaaa	1200
gattgtggga	ccatggcacg	gcattacaaa	cgagcacaaa	gaaaatcatt	atctatgtca	1260
gcctggataa	ggtatagatg	tgatagagca	aaggatggag	gcaactggag	agaaattgct	1320
aaatttttta	gatatcaagg	tgtaaacctt	atgtccttta	ttcaaatggt	taaacagttt	1380
ttaaaaggaa	caccaaaaaca	caattgcata	gtcatatatg	gccacccaaa	cacaggcaag	1440
tcattatttg	caatgagcct	aatgaagttt	atgcaagggt	ccattatttc	atatgtaaac	1500
tctggtagtc	atttttggtt	acagccacta	gaggatgcta	aaatagcatt	gttagatgat	1560
gctacgtatg	ggtgttgac	atatattgat	cagtatttaa	gaaacttttt	agatggtaat	1620
ccatgtagta	tagatagaaa	acataggagt	ttaatacaat	tagtatgtcc	accattacta	1680
ataacgtcaa	acataaatcc	acaagaggat	gcaaacctaa	tgtatttaca	tacaagggta	1740
acagtattaa	agttttttaa	tacatttcca	tttgataaca	atgggaatgc	tgtgtataca	1800

<210> 58

<211> 21

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> secuencia con la que hibrida el cebador inverso para VPH 51

5

10

ES 2 684 746 T3

<400> 58
 actggacagt tatccggaca g 21
 <210> 59
 <211> 1943
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia génica E1 de los nucleótidos 864 – 2807 de VPH 52
 <400> 59
 tggaggacc tgaaggtaca gagggcgaaa gggagggatg tacaggctgg tttgaagtaa 60
 aggcaataat agaaaaacaa acaggagata acatttcaga ggacgaggat gaaaatgcat 120
 atgatagtgg aacagatcta atagatttta tagatgattc aaatataaat aatgaacagg 180
 cagaacatga ggcagcccgg gcattgttta atgcacagga aggggaggat gatttacatg 240
 ctgtgtctgc agtaaacga aagtttacia gcagtccgga aagtgctggg caagatggtg 300
 tagaaaaaca tggtagtccg cgtgcaaac acatttgtgt aaatacagag tgtgttttac 360
 caaacgcaa accatgtcac gtagaagaca gcggtatgg caatagtga gtggaagcgc 420
 agcagatggc agaccaggta gacgggcaaa atggcgactg gcaaagtaac agtagtcaat 480
 caagtggggt gggggctagt aattcagatg taagttgtac tagtatagag gacaatgagg 540
 aaaatagtaa tagaacgcta aaaagcatac aaaatattat gtgcgaaaat agcataaaaa 600

ES 2 684 746 T3

caacgggtatt atttaaattt aaagaaacat atgggtgtag ctttatggaa ttagtaagac 660
catttaaaag taatagaagt agttgtacag attgggtgat tataggaatg ggagtaacac 720
catcagttgc agaaggatta aaagtattaa tacagcccta tagcatatat gccatttgc 780
aatgtttaac atgtgacaga ggcgtgctta tactgctgct aattagggtt aaatgtggaa 840
aaaacagatt aacagtgtcc aaactaatgt cacagctgtt aaatatacca gaaacacata 900
tggaataga accaccaaaa ttacgaagtg ctacctgtgc attatattgg tatagaacag 960
gtttgtctaa tattagtgag gtatatggta ccaccccaga atggatagaa caacaaacag 1020
tattacagca tagctttgac aatagcatat ttgattttgg agaaatggg caatgggcat 1080
atgatcatga tataacagat gatagtgaca tagcatataa atatgcacag ttagcagatg 1140
taaatagcaa tgctgcagca ttcctaaaaa gcaattcgca agcaaaaata gtaaaggact 1200
gtgcaacat gtgtagacat tataaacggg cagaaagaaa acatatgaat attggacaat 1260
ggatacagta tagatgtgat agaatagatg atgggtggaga ttggaggcct atagtaagat 1320
ttttaagata tcaagacata gaatttacag cttttttaga cgcattttaa aaatttttaa 1380
aaggatatac taaaaaaaaat tgtttagtat tatatggacc tgcaaacaca ggaaaatcat 1440
attttggaat gagtttaatt aggttcttaa gtggatgtgt aatatcctat gtaaactcaa 1500
aaagccattt ttggctacaa ccattaacag atgcaaaaagt gggatgata gatgatgtaa 1560
cacctatatg ttggacatat atagatgatt atatgagaaa tgcactggat ggaaatgata 1620
tatcagtaga tgtaaagcat agagccttag tacaataaaa atgcccacca ttaattttaa 1680
caacaaatac aaatgcagga acagatccta ggtggccata tttacatagt agattggttg 1740
tgtttcattt caaaaaccca tttccatttg atgaaaatgg caatcccata tatgaaatta 1800
acaacgaaaa ttggaaatcc tttttctcaa ggacgtggtg caaattagat ttaatacag 1860
aagaggacaa ggaaaacgat ggagtcgata ccggcacggt taaatgcagt gcaggaaaaa 1920
atactagatc tatacgaagc tga 1943

5 <210> 60
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> Región de VPH 52 que es objetivo del cebador inverso
10 <400> 60
agacagcggc tatggcaata g 21
<210> 61
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial
15 <220>
<223> el complemento inverso de SEQ ID N.º 60
<400> 61
ctattgcat agccgctgtc t 21
20 <210> 62
<211> 1911

ES 2 684 746 T3

<212> ADN
<213> artificial

<220>

<223> Secuencia génica E1 de los nucleótidos 895 – 2805 de VPH 56

5

<400> 62

```

atggcgtcac ctgaaggtac agatggggag ggaagggat gttgtgatg gtttgaagta      60
gaggcaattg tagaaaaaa aacaggagat aaaatatcag atgatgaaag tgacgaggag      120
gatgaaatag atacagatth agatggatth atagacgatt catatataca aaatatacag      180
gcagacagag agacagctca acaattgthg caagtacaaa cagcacatgc agataaacag      240
acgttgcaaa aactaaaacg aaagtatata gctagtccat taagtgatat tagtaatcag      300
caactgtgtg gccgggaagg agtaaacggg aggcttattt taccagacct acaagacagc      360
gggtatggca atacattgga aactctggaa acaccagaac aggtagatga agaggtacag      420
ggacgtgggt gcgggaatac acaaatgga ggctcacaaa acagtaccta tagtaacaat      480
agtgaggact ctgtaataca tatggatatt gatagaaaca atgaaacgcc aacacaacaa      540
ttgcaggact tgtttaaaag tagcaattta caaggtaaat tatattataa atttaaagaa      600
gtgtatggta ttccattttc agaattggtg cgtacgttta aaagtgatag tacatgttgc      660
aatgattgga tatgtgctat atttggtggt aatgaaacat tagccgaggc actaaaaact      720
ataataaac cacactgtat gtattatcat atgcaatggt taacatgtac atgggggggt      780
atagtaatga tgctaattag atatacatgt ggcaaaaaca gaaaaacaat tgcaaaagca      840
ttaagctcaa tattaatgt accacaggag caaatgttaa ttcaaccacc aaaaatacga      900
agtctgctg tagctttata tttttataaa acagcaatgt caaatattag tgatgtgtat      960
ggagacacac cagaatggat acaaagacaa acacaattgc aacacagttt acaggatagt     1020
caatttgaat tatctaaaat ggtgcagtgg gcatttgata atgaagtaac agatgatagc     1080
caaatgctg ttcaatatgc acaattagca gatgtagaca gcaatgcaca agccttttta     1140
aaaagcaata tgcaggcaaa atatgtaaag gattgtggaa taatgtgtag acattataaa     1200
agggcacaac agcaacaaat gaatatgtgc cagtggataa agcacatatg tagtaaaaca     1260
gatgaagggg gtgattggaa acccattgta caatthttta gatatcaagg ggtcgatttc     1320
atthcatttc taagttactt taaattatth ctacaaggaa cacctaaaca taactgtthg     1380
gtactthtg gaccgcaaaa tacaggtaaa tcatgctthg ctatgagtct tataaagtht     1440
thtcaagggt ctgtcatttc atthgtgaat tcacaaagcc actthtggtt gcagccatta     1500
gacaatgcta aacttggtt gthgatgat gcaacagaaa tatgthgga atatatagac     1560
gattatthta ggaatthgt agatggaaat cctataagth tagatagaaa acataaacaa     1620
ttagtacaaa taaaatgtcc accattacta attacaacca atataaatcc tatgctagat     1680
gctaaattac gatatthaca cagtagaatg ttagththtc agthtcaaaa thcattthca     1740
ttagataata atgghaatcc tgtatatgaa ttaagtaatg taaactgga atgththctt     1800
acaaggactg ggtccagatt aaatthgat aacgacgagg acaaaagaaa caatggagac     1860
gctthcccaa cgtthaaatg tgtgccagaa caaaatacta gactgththg a           1911

```


ES 2 684 746 T3

<210> 63
 <211> 1893
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia génica E1 de los nucleótidos 895 – 2787 de VPH 66

```

<400> 63
atggcatcac ctgaaggtac aaatggggag gggacgggat gttgtggatg gtttcaggta      60
gaagcaattg tagaaagaaa aacgggggat acaatatcag atgatgaaag cgaggaggag      120
aatgaaacag atacagattt agatggattt atagacaata cacttataaa caatacacag      180
gaagacaggg agacagctca acaattattg caagtacaaa cagcacatgc agatgcacag      240
acgttgcaaa aactaaaacg aaagtatata ggtagtcctt taagtgatat tagtaatcag      300
caaaactgtgt accgggagga agtaaacga aggctaatat tatcagaaga cagtgggtat      360
ggcaatacat tggaaacatt ggaaacatca caacaggtag aatacgaaaa gggaaatggg      420
tgcgggagct cacaaaatgg aggctcgcaa aacagtaact gtagtgagca ctcgggtgta      480
aatatggata tagatacaaa tatggaaaca ccaacacacc aattgcagga actatttaaa      540
agtagtaacg cacaaggaag attacatttt aaatttaaag aagtgtatgg agtgccatat      600
acagagttgg tgcgaacatt taaaagcgat agtacatggt gtaacgattg gatatgtgca      660
atatttggtg ttaatgaaac attagcagaa gcgttaaaaa ctatactaaa accacaatgt      720
gtgtactatc atatgcaatg cctaacaatgt tcatgggggg taattgtaat gatgctaatt      780
agatatatat gtggaaaaaa cagaaaaaca attacaaaat cgctaagctc aattttaaat      840
gtaccacaag agcaaatggt aattcaacca ccaaaactac gaagtcctgc tgtggcatta      900
tatttttata aaacagcaat gtcaaatatt agtgaggtgt atggggaaac accagaatgg      960
atacaaagac agacacaatt gcaacacagt ttacaagaca atcaatttga attgtctaaa     1020
atggtacagt gggcatttga taatgacgta acagatgata gccaaattgc ctttttatat     1080
  
```

ES 2 684 746 T3

gcacaactag cggacataga tagtaatgca caagcatttt tagaaagtaa tatgcaagca 1140
 aaatatgtaa aggattgtgg aataatgtgt agacattata aaagggcaca gcaacagcaa 1200
 atgaatatgt gccagtggat aaagcatata tgtagtaaag tagatgaagg gggtgattgg 1260
 aaaccattg cgcaattttt acgatatcaa ggggtcgact tcatttcatt ttttaagttat 1320
 tttaaattat ttttacaagg cacgcctaaa cataattggt tggactgtg tggaccacca 1380
 aatacaggta aatcatgttt tgctatgagc cttataaatt tttccaagg gtcagtcatt 1440
 tcatttgta attcacaag cacttttgg ttacagccac tagacaatgc caaattaggg 1500
 ttgctggatg atgcaacaga tacgtgttg agatataatg atgattatct aagaaattta 1560
 ttagatggga atcccataag tttagatagg aaacataaac aattagtaca aataaaatgt 1620
 cctccagtca ttattacaac taatgtaaat cctatgcaag atgcaaaatt aagatatcta 1680
 cacagtagaa tttcagtgtt taagtttgaa aatccatttc cattagataa caatggtaat 1740
 cctgtgtatg aattgagtaa tgtaaattgg aatgttttt ttgaaaggac atggtccaga 1800
 ttaaattcgg ataacgacga ggacaaagaa aacaatggag actctatccc aacgtttaga 1860
 tgcgtgccag aacaaaatac taggctgtta tga 1893

5 <210> 64
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> secuencia objetivo de VPH 66 para el cebador inverso. VPH16/31/33/33N/35/39/52/56/58/66R

10 <400> 64
 agacagtggg tatggcaata c 21

<210> 65
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial

15 <220>
 <223> complemento inverso de SEQ ID N.º 64

<400> 65
 gtattgcat acccactgtc t 21

20 <210> 66
 <211> 1935
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia génica E1 de los nucleótidos 883 – 2817 de VPH 58

ES 2 684 746 T3

<400> 66
atggatgacc ctgaaggtac aaacggggta ggggcgggct gtactggctg gtttgaggta 60
gaagcagtaa tagaacgaag aacaggagat aatatttcag atgatgagga cgaaacagca 120
gacgatagtg gtacagattt aatagagttt atagatgatt cagtacaaag tactacacag 180
gcagaagcag aggcagcccg agcgttgttt aatgtacagg aaggggtgga cgatataaat 240
gctgtgtgtg cactaaaacg aaagtttgca gcatgctcag aaagtgtgtg agaggactgt 300
gtggaccggg ccgcaaatgt gtgtgtatcg tggaaatata aaaataaaga atgcacacac 360
agaaaacgaa aaattattga gctagaagac agcggatatg gcaatactga agtggaaact 420
gagcagatgg cacaccaggt agaaagccaa aatggcgacg cagacttaa tgactcgag 480
tctagtgggg tgggggctag ttcagatgta agcagtgaaa cggatgtaga cagttgtaat 540
actgttccat taaaaatat tagtaatatt ttacataaca gtaatactaa agcaacgcta 600
ttatataaat tcaaagaagc ttatggagta agttttatgg aattagttag accatttaaa 660
agtgataaaa caagctgtac agattggtgt ataacagggt atggaataag tccctccgta 720
gcagaaagtt taaaagtact aattaaacag cacagtatat atacacacct acaatgttta 780
acgtgtgaca gaggaattat attattattg ttaattagat ttaaattag caaaaataga 840
ttaactgtgg caaaattaat gagtaattta ctatcaattc ctgaaacatg tatgattatt 900
gagccaccaa aattacgaag tcaagcatgt gccttatatt ggtttagaac agcaatgtca 960
aatataagtg atgtgcaagg gacaacacca gaatggatag atagattaac agtgttacag 1020
catagcttta atgatgatat atttgattta agtgaaatga tacaatgggc atatgataat 1080
gacattacag atgatagtga cattgcatat aaatatgcac agttagcaga tgttaatagt 1140
aatgcagcag catttttaag aagcaatgca caagcaaaa tagtaaaaga ctgtggcggt 1200
atgtgcagac attataaaag agcagaaaag cgtggtatga caatgggaca atggatacaa 1260
agtaggtgtg aaaaaacaaa tgatggaggt aattggagac caatagtaca atttttaaga 1320
tatcaaaata ttgaatttac agcattttta gttgcattta aacagttttt acaaggtgta 1380
ccaaaaaaaa gttgtatggt actgtgtggc ccagcaaata cagggaaatc atattttgga 1440
atgagtttaa tacatttctt aaaaggatgc attatttcat atgtaaattc caaaagtcatt 1500
ttttggttgc agccattatc agatgctaaa ctaggatga tagatgatgt aacagccata 1560
agctggacat atatagatga ttatatgaga aatgcattag atggtaacga catttcaata 1620
gatgtaaaac atagggcatt agtacaatta aatgtccac cattaataat tacctcaaat 1680
acaaatgcag gcaaagattc acgatggcca tatttgaca gtagactaac agtatttgaa 1740
ttaacaatc catttcatt tgatgcaaat ggtaatccag tgtataaat aatgatgaa 1800
aattggaat cctttttctc aaggacgtgg tgcaaattag gcttaataga ggaagaggac 1860
aaggaaaacg atggaggaaa taccagcacg tttaagtgca gtgcaggaca aaatcctaga 1920
catatacga gctga 1935

5

<210> 67
<211> 1934
<212> ADN
<213> artificial

ES 2 684 746 T3

<220>

<223> Secuencia génica de E1 de los nucleótidos 872 – 2806 de VPH 59

<400> 67

tggccgattc	ggaaggtaca	gatggggaag	ggacgggggtg	caatggatgg	ttttttgtgc	60
aggcaatagt	agataaaaaa	acaggtgaca	aaatttcaga	tgacgaggat	gaaaatgcaa	120
cagatacagg	ttcagacttg	gtagacttta	ttgatgatac	cacaacaatt	tgtgtacagg	180
cagagcgcga	gacagcacag	gccttgttta	atgtgcagga	agcccaaagg	gatgcacggg	240
aaatgcatgt	tttaaaacga	aagtttgggt	gcagtataga	aaacagtagt	gagaaagcgg	300
cggcaggaac	aaaagctaag	tcaccattac	aagaaatc	agtaaatgtt	aaccacccaa	360
aagtaaagag	aaggttacta	acagtgccag	acagcggcta	tggctattct	gaagtggaaa	420
tgctcgagac	tcagtaacc	gtggagaata	ctggaaatgg	ggacagcaat	ggcagtgttt	480
gtagcgacag	tcaaatagac	gtagcgaca	gcagtaacat	ggatgttgaa	aacatagttc	540
caacatcccc	cactaatcaa	ttgttacagt	tattacatag	caaaaataag	aaagcagcta	600
tgtatgcaaa	atttaaagaa	ttgtatgggt	tatcatttca	agatttggtt	aggacattta	660
aaagtgcag	aactacctgt	agcgattggg	taaccgccat	ttttggtgta	aatccaactg	720
tagcagaagg	atttaaaca	ttaatacaac	cctatgtgct	atatgcacat	atacaatgtt	780
tagattgtgc	atggggagta	gtaatattag	cattattaag	atataaatgt	ggaaaaata	840
gaataacagt	tgcaaaagga	cttagcacat	tactacatgt	accagatacg	tgcatgttaa	900
ttgaaccacc	caaattgcgt	agtgggtgtg	cagcattata	ttggtacaga	acaggaatgt	960
ccaatattag	tgaagttata	ggggaaacgc	ccgaatggat	acaagacta	acaattatac	1020
aacatggagt	tgatgatagc	gtgtttgacc	tgtcagaaat	gatacaatgg	gcgtttgata	1080
atgacctaac	agatgaaagt	gatattgcat	atgaatatgc	attaatagca	gatagtaata	1140
gtaacgccgc	tgcattttta	aaaagcaact	gccaggcaaa	atacctaaa	gattgtgcag	1200
ttatgtgtag	gcattataaa	agagcacaaa	aaagacaaat	gagtatgtca	cagtggataa	1260
aatggagatg	tgataaaata	gaagaggggg	gagattggaa	acccatagta	caatttttaa	1320
gatatcaagg	agtagaattt	ataacgtttt	tatgtgcatt	aaaagatttt	ttaaaggta	1380
ccccaaaaag	aaattgcatt	gtgctgtgtg	ggccagcaaa	tacaggcaag	tcatactttg	1440
gaatgagcct	gctacatttc	ttacaaggaa	ctgtaatttc	acatgtaaat	tcaaatagtc	1500
acttttggtc	agaaccttta	acagatgcta	aattagctat	gctagacgat	gcaacagata	1560
gttgttgac	atattttgat	acatatatgc	gaaatgctct	ggatggcaat	cctataagtg	1620
tagatagaaa	gcataggcac	ctagtacaaa	ttaaatgtcc	accaatgctt	attacatcaa	1680
atacaaatcc	agttacagat	aacaggtggc	catacctaaa	tagcagacta	atggtattta	1740
aatttcctaaa	caaatttcca	tttgacaaaa	atagaaatcc	agtatataca	attaatgaca	1800
gaaactggaa	atgttttttt	gaaaggacgt	ggtgcagatt	agatttgaac	gaggaagagg	1860
atgatgcaga	cagtgatgga	caccctttcg	cagcgtttaa	gtgtgttaca	ggatcaaata	1920
ttagaacatt	atga					1934

ES 2 684 746 T3

<210> 68
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> región objetivo del cebador inverso para VPH 59, m significa un cambio de nucleótido c/a

<400> 68
 gaaggtamt aacagtcca gaca 24

10

<210> 69
 <211> 1923
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia génica E1 de los nucleótidos 824 – 2746 de VPH 68 <400> 69

15

atggccaatt	gtgaaggtag	agatggggac	gggacggggt	gtaacggatg	gtttttcgta	60
caagcaatag	tagataaaca	aacaggtgac	acagtctcag	aggatgagga	tgaaaacgcg	120
acagatacag	gttcagacat	ggtagatttc	attgatgatg	ctacagatat	ttgtatacag	180
gcagagcgtg	agacagcaca	ggtactgtta	aatatgcaac	aggcccaaag	ggatgcacaa	240
acagtgcgtg	ccctaaaacg	aaagtataca	gacagtatag	aaagcagccc	tttagcaaag	300
tcgccattac	aggaactatc	aataaatgta	agcagtacac	aggcaagaca	accggcgtat	360
acagtgcccg	acagcggcta	tggcaatatg	gaagtggaaa	ctcactcgga	ggtaactgta	420
gcaactaata	caaatggggc	ggacggggag	gatgaagggg	aaaatggcga	cagcatacgg	480
gaggactgta	gtagtgtaga	cagtgctata	gatagtgaaa	accaggatcc	taaatcacct	540
actactcaac	taaaagtatt	attacaatgt	aataataaaa	aagctgcaat	gttaacagaa	600
tttaaaaaag	tatatggatt	gtcctttaat	gacctagtag	gtacatttaa	aagtgataag	660
accacatgta	cggactgggt	agcagcaata	tttggagtaa	atccaacccat	tgccgaaggg	720

ES 2 684 746 T3

tttaaaacac taattaaaca atatgcatta tatacccata tacaatgttt agatacaaaa 780
aacggaatat taatattaat gttaataaga tataaatgtg ggaaaaatag aataacagta 840
ggaaaaggat taagtacatt gttgcatgtt ccagacagct gtatgctttt gcagccacca 900
aaattgcgta gccctgttgc agcattgtat tggatatagaa caggaatatac taatattagt 960
gaggtgtgtg gagacacgcc agaatggata aaaagattaa ctataataca acatggaata 1020
gatgatagtg tatttgatct atcagacatg gtacaatggg catttgataa tgagttaaca 1080
gatgaaagtg atatagcatt ttcatatgct atgttggcag attgtaatag taatgctgca 1140
gcgtttttaa aaagcaactg ccaagcaaaa tatgtaaaag attgtgcaac aatgtgtaga 1200
cattacaaac gggcacaaaa acgacaaatg tcaatgccgc aatggattaa attcagatgc 1260
agtaaatgtg atgaaggtgg tgattggcga ccaattgtac agtttttaag atatcagggg 1320
ctagaattca taacattctt atgtgcatta aaagattttt taaaaggcac gccaaaacgt 1380
aattgtatag ttatacatgg gccaccaaact actggcaagt catatttttg catgagtctt 1440
atacatttct tgcaaggcac aataatttca tatgtaaaatt cagctagtca cttttggtta 1500
gagccacttg cagatgcaaa aatagccatg ttagatgacg caacaggtac atgttgggtca 1560
tattttgata attaccatgag aaatgcatta gatggtaacc caataagttt agatagaaaa 1620
cacagacacc taatacaaat aaaatgtcca ccaatgctaa taacatcaaa tactaacct 1680
gtggaagaca ataggtggcc gtatttacct agcagactaa ctgtatttaa atttcctaat 1740
gcatttccat ttgaccaaaa caggaaccca gtgtatacaa tgaatgataa aaactggaaa 1800
tgtttttttg aaaagacttg gtgcaaatta gacttgcagc aggacgagga tgaaggagac 1860
aatgatgaaa acactttccc aacgttttaa tgtgttacag gagaaaatat tagaacatta 1920
tga 1923

5 <210> 70
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> región de VPH68 con la que hibrida el cebador inverso para VPH68

10 <400> 70
agcaaagtgc ccattacagg a 21
<210> 71
<211> 24
<212> ADN
<213> artificial

15 <220>
<223> Secuencia objetivo para VPH 16 R HEX
<400> 71
ataatgatta ttaacacag gcag 24

20 <210> 72
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial

<220>

<223> Secuencia objetivo para VPH18 R HEX

<400> 72

aaggaacatt ttgtgaacag g 21

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar si una muestra resulta positiva en virus del papiloma humano (VPH) oncogénico, comprendiendo el método:

5 combinar la muestra con cebadores para la amplificación con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real de una región objetivo de genomas de VPH oncogénicos, y una sonda marcada pan-VPH capaz de emitir una señal tras la amplificación de la región objetivo, proporcionar condiciones para la PCR en tiempo real, y medir una señal emitida desde la sonda marcada pan-VPH, donde la detección de la señal indica que la muestra resulta positiva en VPH oncogénico,

10 **caracterizado por que** la sonda pan-VPH es una molécula de ácido nucleico bloqueado marcada (LNA) comprendiendo la secuencia ACTTTCGTTT (SEQ ID N.º 25) o el complemento inverso de esta.

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la sonda pan-VPH es una molécula marcada con 10 nucleótidos de la secuencia que consiste en ACTTTCGTTT (SEQ ID N.º 25), o el complemento inverso de esta y/o la sonda pan-VPH está marcada en su extremo 5' con un fluorocromo y en su extremo 3' con un extintor, y donde la señal emitida tras la amplificación de la región objetivo es de fluorescencia.

15 3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, donde los cebadores son para la amplificación de una región objetivo de cualquiera de entre VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 o VPH68 y/o comprendiendo combinar la muestra con una combinación de cebadores para la amplificación de una región objetivo de la totalidad de VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 o VPH68.

20 4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los cebadores comprenden uno o más de los siguientes pares de cebadores:

a) para VPH16, SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 14.

b) para VPH18, SEQ ID N.º 2 y SEQ ID N.º: 15

c) para VPH33/33n, SEQ ID N.º 3 y SEQ ID N.º 14

25 d) para VPH31, SEQ ID N.º 4 y SEQ ID N.º 14

e) para VPH35, SEQ ID N.º 5 y SEQ ID N.º 14

f) para VPH39, SEQ ID N.º: 6 y SEQ ID N.º 14

g) para VPH45, SEQ ID N.º 7 y SEQ ID N.º 15

h) para VPH51, SEQ ID N.º 8 y SEQ ID N.º 16

30 i) para VPH52, SEQ ID N.º 9 y SEQ ID N.º 14

j) para VPH56/66, SEQ ID N.º 10 y SEQ ID N.º 14

k) para VPH58, SEQ ID N.º 11 y SEQ ID N.º 14

l) para VPH59, SEQ ID N.º 12 y SEQ ID N.º 17

m) para VPH68, SEQ ID N.º 13 y SEQ ID N.º 18

35 y/o donde los cebadores comprenden todos los pares de cebadores (a) a (m).

5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo combinar la muestra con cebadores para la amplificación de una región objetivo de VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 y VPH68,

detectar una señal desde la sonda marcada pan-VPH, y

40 concluir que la muestra resulta positiva en VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 o VPH68.

6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo combinar la muestra con cebadores para la amplificación de una región objetivo de VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 y VPH68,

45 no detectar ninguna señal desde la sonda marcada pan-VPH, y

concluir que la muestra resulta negativa en VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 y VPH68.

7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo además combinar la muestra con cebadores para la amplificación de una región objetivo de VPH33n,

- y una sonda marcada 33n capaz de emitir una señal tras la amplificación de la región objetivo, donde la sonda 33n y la sonda pan-VPH portan la misma marca,
- proporcionar condiciones para la PCR en tiempo real, y
- 5 medir una señal emitida desde la sonda marcada 33n o la sonda pan-VPH, donde la detección de la señal indica que la muestra resulta positiva en VPH oncogénico,
- caracterizado por que** la sonda 33n es una molécula de ácido nucleico bloqueado (LNA) marcada comprendiendo la secuencia ACTTTCGCTT (SEQ ID N.º 26), o el complemento inverso de esta y/o la sonda 33n es una molécula marcada con 10 nucleótidos de la secuencia que consiste en ACTTTCGCTT (SEQ ID N.º 26), o el complemento inverso de esta.
- 10 **8.** Método de acuerdo con la reivindicación 10, donde la sonda pan-VPH y la sonda 33n están marcadas en el extremo 5' con un fluorocromo y en el extremo 3' con un extintor, y donde la señal emitida tras la amplificación de sus respectivas regiones objetivo es de fluorescencia con la misma longitud de onda.
- 9.** Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo además determinar si la muestra resulta positiva en VPHI6 o VPHI8, comprendiendo el método
- 15 combinar la muestra con cebadores para la amplificación con PCR en tiempo real de una región objetivo de los genomas de VPH16 y VPH18,
- y una sonda 16/18 marcada capaz de emitir una señal tras la amplificación de una región objetivo,
- proporcionar condiciones para la PCR en tiempo real, y medir
- una señal desde la sonda 16/18 marcada,
- 20 donde la detección de una señal indica que la muestra resulta positiva en VPHI6 o VPH18,
- caracterizado por que** la sonda 16/18 es una molécula de ácido nucleico bloqueado (LNA) marcada comprendiendo la secuencia ATATCWGATGACGAG (SEQ ID N.º 27).
- 10.** Método para determinar si una muestra resulta positiva en virus del papiloma humano (VPH) oncogénico VPH16 y/o VPH18, comprendiendo el método
- 25 combinar la muestra con cebadores para la amplificación con PCR en tiempo real de una región objetivo de los genomas de VPH16 y VPH18,
- y una sonda 16/18 marcada capaz de emitir una señal tras la amplificación de la región objetivo,
- proporcionar condiciones para la PCR en tiempo real, y medir
- una señal desde la sonda 16/18 marcada,
- 30 donde la detección de una señal indica que la muestra resulta positiva en VPHI6 o VPH18,
- caracterizado por que** la sonda 16/18 es una molécula de ácido nucleico bloqueado (LNA) marcada comprendiendo la secuencia ATATCWGATGACGAG (SEQ ID N.º 27), o el complemento inverso de esta.
- 11.** Método de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, donde la sonda 16/18 es una molécula marcada con 15 nucleótidos de la secuencia que consiste en ATATCWGATGACGAG (SEQ ID N.º 27), o el complemento inverso de esta.
- 35 **12.** Método de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 15, donde la sonda 16/18 lleva una marca distinta de la de la sonda pan-VPH.
- 13.** Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, donde la sonda 16/18 está marcada en su extremo 5' con un fluorocromo y en su extremo 3' con un extintor, y donde la señal emitida tras la amplificación de la región objetivo es de fluorescencia.
- 40 **14.** Método de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, donde la sonda 16/18 emite una señal fluorescente con una longitud de onda distinta de la de la sonda pan-VPH.
- 15.** Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, donde los cebadores comprenden uno o ambos de los siguientes pares de cebadores:
- 45 a) para VPH16, SEQ ID N.º: 19 y SEQ ID N.º 20
- b) para VPHI8, SEQ ID N.º: 21 y SEQ ID N.º: 22
- 16.** Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo además llevar a cabo un control positivo para la PCR en tiempo real, comprendiendo

combinar la muestra con cebadores para la amplificación con PCR en tiempo real de una secuencia de ADN control preferiblemente ADN humano, presente en la muestra, y una sonda control marcada capaz de emitir una señal tras la amplificación de la secuencia de ADN control preferiblemente ADN humano,

proporcionar condiciones para la PCR en tiempo real, y

5 medir una señal desde la sonda control,

donde la detección de la señal indica que la PCR en tiempo real es funcional.

17. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra es una muestra de citología de base líquida de un frotis cervical humano.

10 **18.** Composición comprendiendo una sonda marcada de ácido nucleico comprendiendo la secuencia de nucleótidos ACTTTCGTTT (SEQ ID N.º 25) o el complemento inverso de esta y una marca detectable.

19. Composición de acuerdo con la reivindicación 23, donde la sonda comprende nucleótidos LNA.

20. Composición de acuerdo con la reivindicación 23 o con la reivindicación 24, donde la sonda es una molécula con 10 nucleótidos de la secuencia que consiste en ACTTTCGTTT (SEQ ID N.º 25) o el complemento inverso de esta marcada con un fluorocromo y un extintor.

15 **21.** Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, donde la sonda está marcada en su extremo 5' con un fluorocromo y en su extremo 3' con un extintor.

22. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26 al realizar PCR en tiempo real para la detección de VPH.

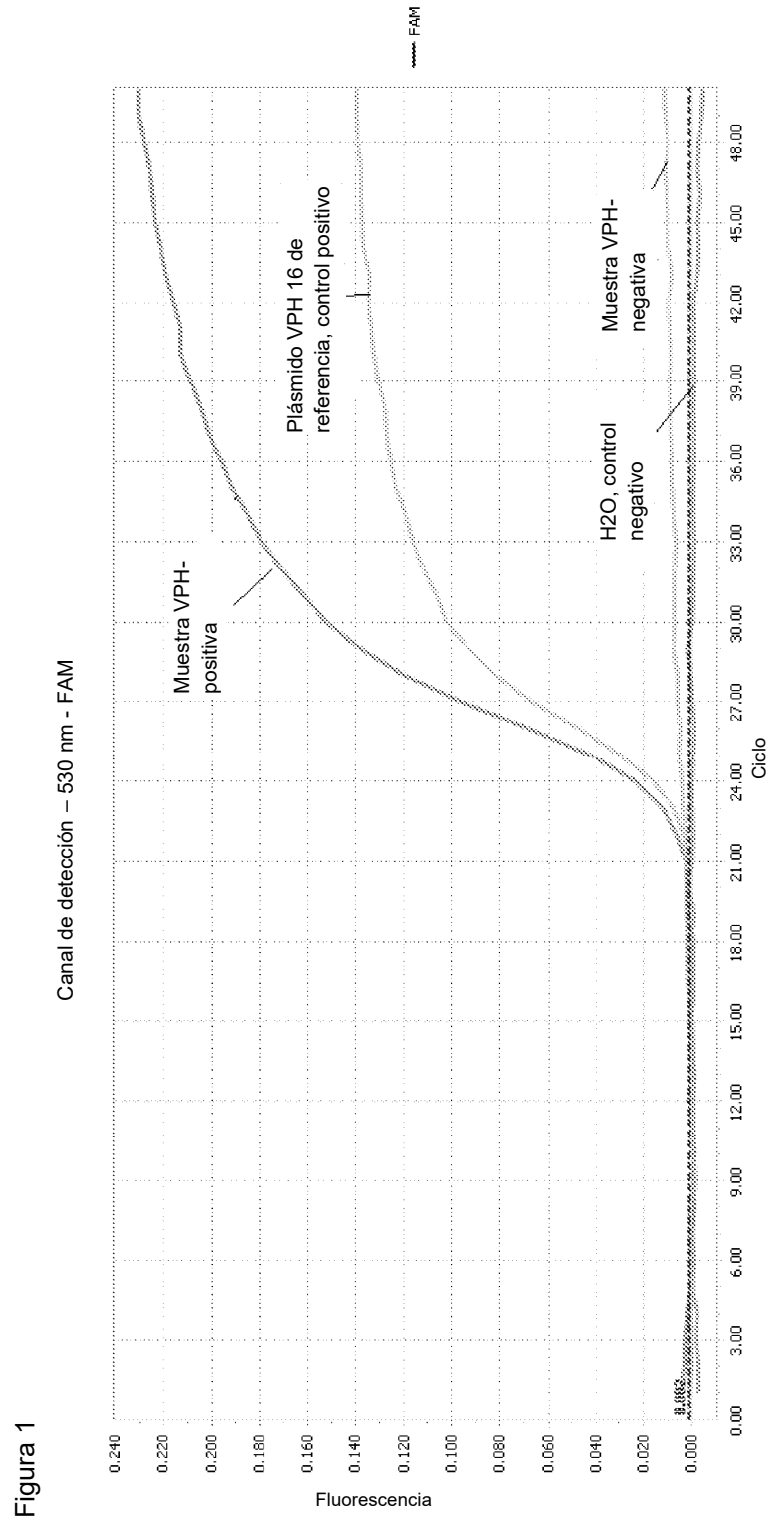


Figura 2

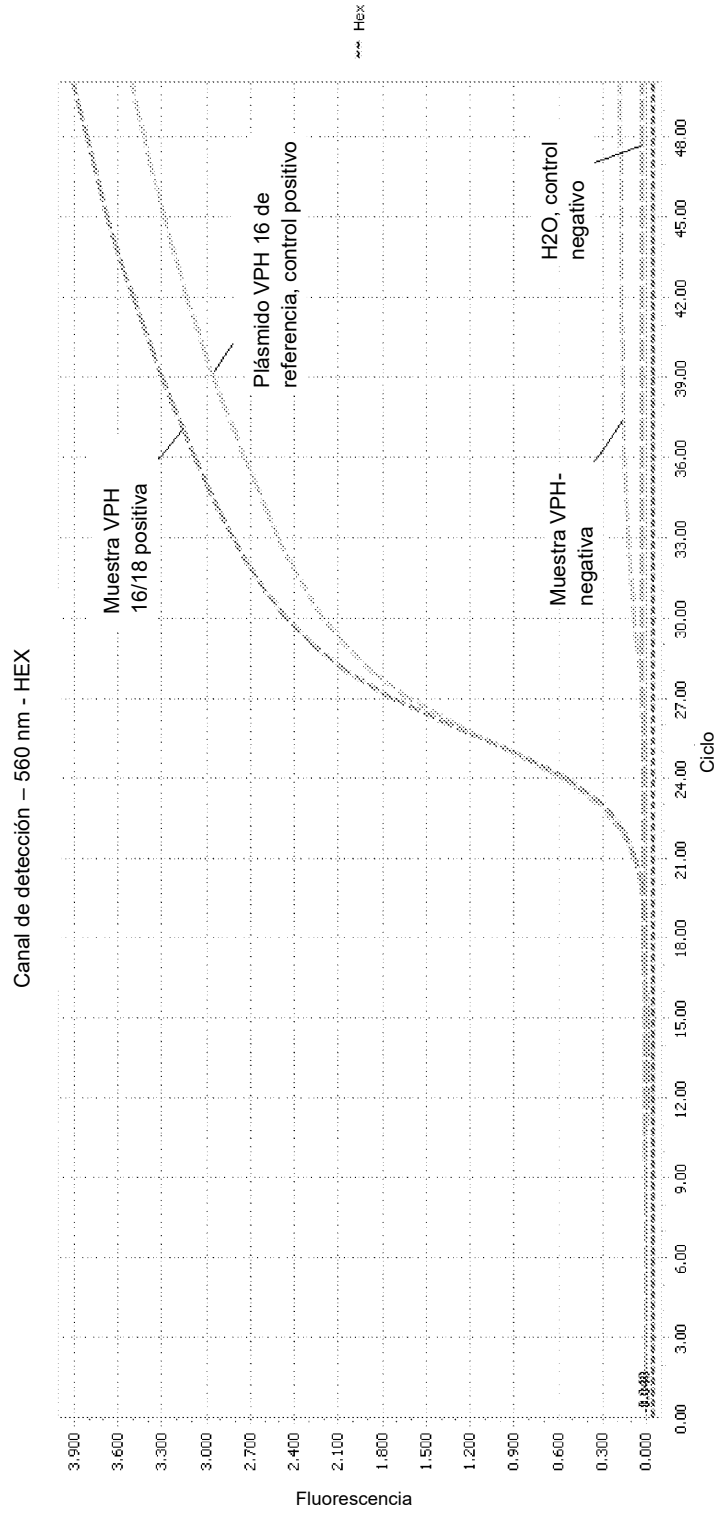
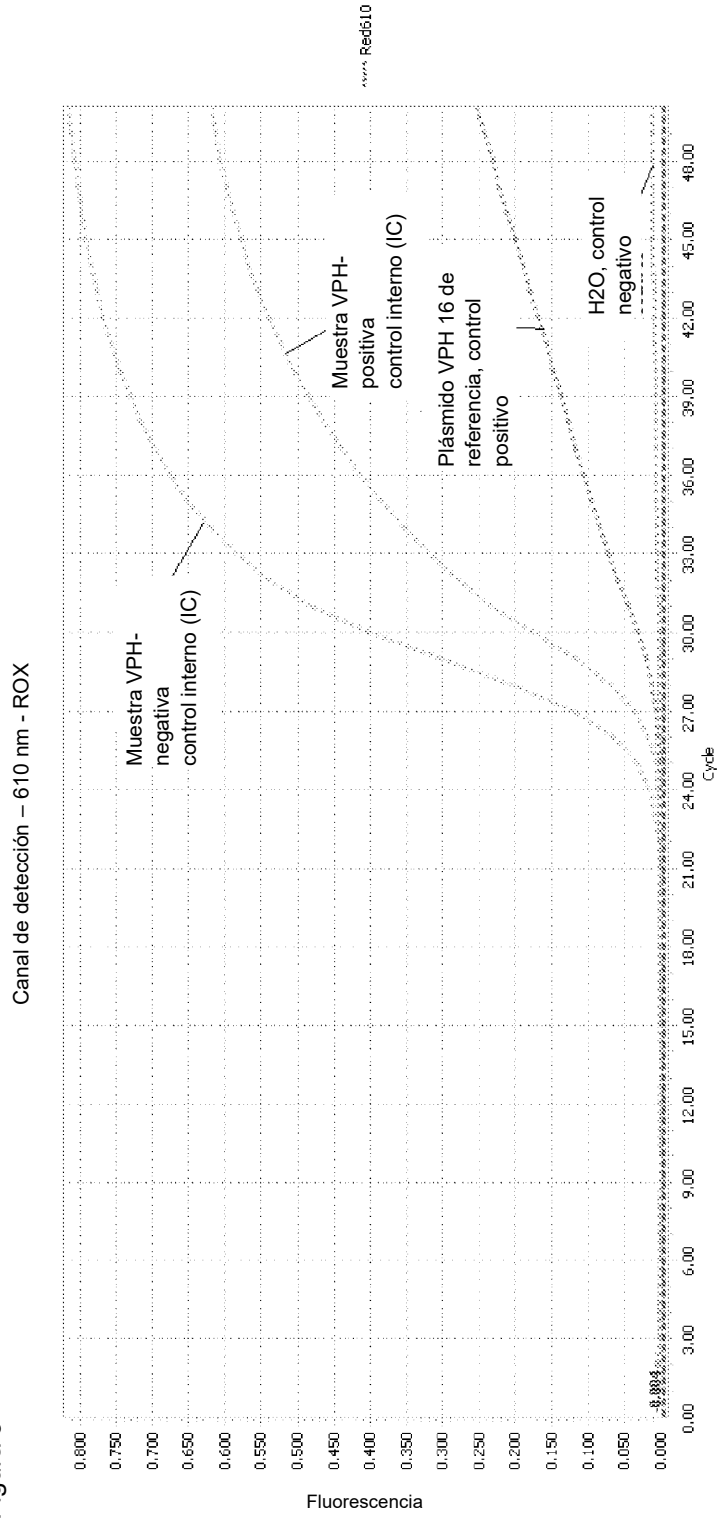


Figura 3



ES 2 684 746 T3

Figura. 4

A: SONDA pan-VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 66, 58, 59 y 68

HPV16 E1 SEQ ID NO: 33:
 1081 gcacaggaag caaaacaaca tagagatgca gtacaggttc taaaacgaaa gttatttgggt
 1141 agtccactta gtgatattag tggatgtgta gacaataata ttagtcctag attaaaagct
 1201 atatgtatag aaaaacaaag tagagctgca aaaaggagat tatttgaaag cgaagacagc
 5'-actttcgttt-3' SEQ ID NO: 25

B: SONDA VPH33n

HPV 33n SEQ ID NO: 35:
 1081 cattgtttaa tatacaggaa ggggaggatg acttaaatgc tgtgtgtgca ctaaagcgaa
 1141 agtttggccgc atgttcacaa agtgctgcgg aggacgttgt tgcctgtgct gcaaaccgct
 1201 gtagaacgtc tattaataaa aataaagaat gcacatacag aaaacgaaaa atagatgagc
 1261 tagaagacag cggatatggc aatactgaag tggaaactca gcagatggta caacaggtag
 5'-actttcgctt-3' SEQ ID NO: 36

C: SONDA VPH 16/18

HPV16 E1 SEQ ID NO: 37:
 901 acgggatgta atggatggtt ttatgtagag gctgtagtgg aaaaaaaaaac aggggatgct
 961 atatcagatg acgagaacga aaatgacagt gatacaggty aagatttgggt agattttata
 1021 gtaaatagata atgattattt aacacaggca gaaacagaga cagcacatgc gttgtttact
 1081 gcacaggaag caaaacaaca tagagatgca gtacaggttc taaaacgaaa gtatttgggt
 5'-taatggatggttttatgtagag gct-3' SEQ ID NO: 19
 5'-atatcagatgacgag-3' SEQ ID NO: 38
 5'-ctgctgtgttaataatcattat-3' SEQ ID NO: 20
 5'-ataatgatttttaacacaggcag-3' SEQ ID NO: 71

HPV 18 E1 SEQ ID NO: 40:

901 gcagtaagca acaatggctg atccagaagg tacagacggg gagggcacgg ggtgtaacgg
 961 ctggttttat gtacaagcta ttgtagacaa aaaaacagga gatgtaatat ctgatgacga
 1021 ggacgaaaat gcaacagaca cagggtcggg tatggtagat tttattgata cacaaggaac
 1081 atthtgcgaa caggcagagc tagagacagc acaggcattg tttcatgccc aggaggtcca
 1141 caatgatgca caagtgttgc atgtttttaa acgaaagtgtt gcaggaggca gcaaagaaaa
 1201 cagtccatta ggggagcggc tggaggtgga tacagagtta agtccacggt tacaacaaat
 1261 atcattaat agtgggcaaa aaaaggcaaa aaggcggctg ttcacaatat cagatagtgg
 5'-ggctggttttat gtacaagct-3' SEQ ID NO: 21
 5'-atatcagatgacgag-3' SEQ ID NO: 39
 5'-cctgttcacaaaatgttcctt-3' SEQ ID NO: 22
 5'-aaggaacattttgcgaacagg' SEQ ID NO: 72

D: SONDA pan-VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 66, 58, 59 y 68

HPV 16 E1 SEQ ID NO: 41:
 1081 gcacaggaag caaaacaaca tagagatgca gtacaggttc taaaacgaaa gttatttgggt
 1141 agtccactta gtgatattag tggatgtgta gacaataata ttagtcctag attaaaagct
 1201 atatgtatag aaaaacaaag tagagctgca aaaaggagat tatttgaaag cgaagacagc
 1261 gggtatggca atactgaagt ggaaactcag cagatgttac aggtagaagg gcgcatgag
 5'-gcacaggaagcaaaacaacatag-3' SEQ ID NO: 1
 5'-gtattgccatacccgtgtct-3' SEQ ID NO: 14
 5'-actttcgttt-3' SEQ ID NO: 25
 5'-aaacgaaagt-3' SEQ ID NO: 34.

ES 2 684 746 T3

Figura 5A

HPV 16 E1 (SEQ ID NO: 44)

```

865          atggct gatcctgcag gtaccaatgg ggaagaggg
901 acgggatgta atggatgggt ttatgtagag gctgtagtgg aaaaaaaaaac aggggatgct
961 atatcagatg acgagaacga aaatgacagt gatacaggtg aagatttggt agattttata
1021 gtaaatgata atgattatgt aacacaggca gaaacagaga cagcacatgc gttgtttact
1081 gcacaggaag caaaacaaca tagagatgca gtacaggttc taaaacgaaa gtattttgggt
1141 agtccactta gtgatattag tggatgtgta gacaataata ttagtcctag attaaaaagt
1201 atatgtatag aaaaaaaaag tagagctgca aaaaggagat ttttgaaaag cgaagacagc
1261 gggtatggca atactgaagt ggaaactcag cagatgttac aggtagaagg gcgccatgag
1321 actgaaacac catgtagtca gtatagtggt ggaagtgggg gtggttgca gtcagtacagt
1381 agtggaaagt ggggagaggg tgttagtgaa agacacacta tatgccaaac accacttaca
1441 aatattttaa atgtactaaa aactagtaat gcaaaggcag caatgttagc aaaatttaaa
1501 gagttatacg gggtagtgtt ttcagaatta gtaagaccat ttaaaagtaa taaatcaacg
1561 tgttcgcat ggtgtattgc tgcatttggga cttacacca gtatagctga cagtataaaa
1621 acactattac aacaatattg tttatattta cacattcaaa gtttagcatg ttcattggga
1681 atggttgtgt tactattagt aagatataaa tgtggaaaa atagagaaac aattgaaaaa
1741 ttgctgtcta aactattatg tgtgtctcca atgtgtatga tgatagagcc tccaaaattg
1801 cgtagtacag cagcagcatt atattggat aaaaaggta tatcaaatat tagtgaagtg
1861 tatggagaca cgcagaatg gatacaaaaga caaacagtat tacaacatag ttttaatgat
1921 tgtacatttg aattatcaca gatggtacaa tgggcctacg ataatgacat agtagacgat
1981 agtgaatttg catataaata tgcacaattg gcagacacta atagtaatgc aagtgccttt
2041 ctaaaaagta attcacaggc aaaaattgta aaggattgtg caacaatgtg tagacattat
2101 aaacgagcag aaaaaaaca aatgagtatg agtcaatgga taaaatatag atgtgatagg
2161 gtagatgatg gaggtgattg gaagcaaatt gttatgtttt taaggatca aggtgtagag
2221 tttatgtcat ttttaactgc attaaaaaga tttttgcaag gcatacctaa aaaaaattgc
2281 atattactat atggtgcagc taacacaggt aaatcattat ttggtatgag tttaatgaaa
2341 tttctgcaag ggtctgtaat atgttttcta aattctaaaa gccatttttg gttacaacca
2401 ttagcagatg ccaaaatagg tatgttagat gatgctacag tgccctgttg gaactacata
2461 gatgacaatt taagaaatgc attggatgga aatttagttt ctatggatgt aaagcataga
2521 ccattggtag aactaaaatg cctccatta ttaattacat ctaacattaa tgctgtgaca
2581 gattctaggt ggccttattt acataataga ttggtggtgt ttacatttcc taatgagttt
2641 ccatttgacg aaaacggaaa tccagtgtat gagcttaatg ataagaactg gaaatccttt
2701 ttctcaagga cgtggtccag attaagtttg cagcaggacg aggacaagga aaacgatgga
2761 gactctttgc caacgtttaa atgtgtgtca ggacaaaata ctaacacatt atga

```

HPV 16 F (SEQ ID NO: 1) 5'-gcacaggaagcaaaacaaca tag-3'

SEQ ID NO: 45 5'-agacagcgggtatggcaat ac-3'

HPV16/31/33/33n/35/39/52/56/58/66R (SEQ ID NO: 14): 5'-

gtattgccataccgctgtct-3'

SEQ ID NO: 34 5'-aaacgaaagt-3'

SEQ ID NO: 25 5'-actttcgttt-3'

ES 2 684 746 T3

Figura 5B

HPV 18 E1 (SEQ ID NO: 46)

```

914          atggctg atccagaagg tacagacggg gagggcacgg ggtgtaacgg
961 ctggttttat gtacaagcta ttgtagacaa aaaaacagga gatgtaatat ctgatgacga
1021 ggacgaaaaat gcaacagaca cagggtcgga tatggtagat tttattgata cacaaggaac
1081 attttgcgaa caggcagagc tagagacagc acaggcattg tttcatgctc aggaggtcca
1141 caatgatgca caagtgttgc atgttttaaa acgaaagttt gcaggaggca gcaaggaaaa
1201 cagtccatta ggggagcggc tggaggtgga tacagagtta agtccacggt tacaacaaat
1261 atcattaat agtgggcaaa aaaaggcaaa aaggcggctg ttcacaata t cagatagtgg
1321 ctatggctgt tctgaagtgg aagcaacaca gattcaggta attacaaatg gcgaacaggg
1381 cggcaatgta ttagtgggc gcagtacaga ggctatagac aatgggggca cagagggcaa
1441 caacagcagt gtagacggta caagtgcac tagcaatata gaaaatgtaa atccacaatg
1501 taccatagca caattaaag acttgtaaa agtaacaat aaacaaggag caatgttagc
1561 agtatttaa gacacatat ggctatcatt tacagattta gtagaaat ttaaagtga
1621 taaaaccacg tgtacagatt gggttacagc tataattgga gtaaacccaa caatagcaga
1681 aggatttaa acactaatac agccatttat attatatgcc catattcaat gtcttgactg
1741 taaatgggaa gtattaatat tagccctgtt gcgttacaaa tgggtaaaa gtagactaac
1801 agttgctaaa ggttaagta cgttgttaca cgtacctgaa acttgatgt taattcaacc
1861 accaaaattg cgaagtagt ttgcagcact gtattggtat agaacaggaa tatcaaatat
1921 tagtgaagta atgggagaca cacctgagtg gatacaaga ctactatta tacaacatgg
1981 aatagatgat agcaattttg atttgtcaga aatggtacaa tgggcatthy ataatgagct
2041 gacagatgaa agcgatatgg catttgaata tgccttatta gcagacagca gcagcaatgc
2101 ggctgccttt ttaaaaagca attgccagc taaatattta aaagattgtg ccacaatgtg
2161 caaacattat aggcgagccc aaaaacgaca aatgaatatg tcacagtgga tacgatttag
2221 atgtttaaaa atagatgaag ggggagattg gagaccaata gtgcaatttt tgcgatacca
2281 acaaatagag tttataacat ttttaggagc cttaaaatca tttttaaaag gaactcccaa
2341 aaaaaattgt ttagtattct gtggaccagc aaatacagga aaatcatatt ttggaatgag
2401 ttttatacac tttatacaag gagcagtaat atcatttgta aatttacta gtcatttttg
2461 gttggaaccg ttaacagata ccaaggtggc catgttagat gatgcaacaa ccacgtgttg
2521 gacatacttt gatacctata tgagaaatgc tttagatggc aatcccataa gtattgatag
2581 aaagcacaaa ccattaatac aactaaaatg tcctccaata ctactaacca caaatataca
2641 tccagcaaa gataacagat ggccatattt agaaagtaga ataacagtat ttgaatttcc
2701 aaatgcattt ccatttgata aaaatggcaa tccagtatat gaaataaatg acaaaaattg
2761 gaaatgtttt tttgaaagga catggtccag attagatttg caccgaggaag aggaagatgc
2821 agacaccgaa ggaaaccctt tcggaacggt taagtgcggt gcaggacaaa atcatagacc
2881 actatga

```

HPV 18 F (SEQ ID NO: 2) 5'-aggccacaatgatgcacaag-3'

SEQ ID NO: 47 5'-tcagatagtggctatggctgtt-3'

HPV 18/45 R (SEQ ID NO: 15) 5'-aacagccatagccactatctga-3'

SEQ ID NO: 34: 5'-aaacgaaagt-3'

SEQ ID NO: 25: 5'-actttcgttt-3'

ES 2 684 746 T3

Figura 5C

```

HPV 33 E1 (SEQ ID NO: 48)
879
901 atggggctgg gatggggtgt actggttggg ttgaggtaga agcagtcata gagagaagaa
961 caggagataa ttttcagaa gatgaggatg aaacagcaga tgacagtggc acggatttac
1021 tagagtttat agatgattct atggaaaata gtatacaggc agacacagag gcagcccggg
1081 cattgtttta tatacaggaa ggggaggatg actttaatgc tgtgtgtgca ctaaagcga
1141 agtttgccc atgttcacaa agtgctgagg aggacgttgt tgatcgtgct gcaaaccctg
1201 gtagaacgtc tattaataaa aataaagaat gcacatacag aaaacgaaaa atagatgagc
1261 tagaagacag cggatatgcc aatactgaag tggaaactca gcagatggta caacaggtag
1321 aaagtcaaaa tggcgacaca aacttaaatg acttagaatc tagtgggggtg ggggatgatt
1381 cagaagtaag ctgtgagaca aatgtagata gctgtgaaaa tgttacattg caggaaatta
1441 gtaatgttct acatagtagt aatacaaaag caaataatatt atataaattt aaagaggcct
1501 atggaataag ttttatggaa ttagtgaagc catttaaaag tgataaaaca agctgtacag
1561 attggtgtat aacaggatat ggaattagtc catcagtagc agaaagttta aaagtattaa
1621 ttaaacagca tagtttgtat actcatttac aatgtttaac ttgcatagata ggaataataa
1681 tattattggt aattagattt aggtgtagca aaaacaggtt aaacagtagc aaactaatga
1741 gtaatttatt atcaatacct gaaacatgta tggttataga gccaccaaaag ttacggagcc
1801 aaacatgtgc attgtattgg tttagaacag caatgtcaaa cattagtgtc gtacaaggta
1861 caacacctga atggatagat agactaaactg ttttaacaaca tagctttaat gataatata
1921 ttgatttaag tgaatggta cagtgggcat acgataacga gttaacggac gatagtgaca
1981 ttgcatatta ttatgcacaa cttgcagatt caaatagtaa tgctgctgca tttttaaaaa
2041 gtaactcaca agcaaaaata gtaaggact gtggaataat gtgtagacat tataaaaaag
2101 cagaaaaacg taaaatgtca ataggacaat ggatacaaaag tagatgtgaa aaaacaaatg
2161 atggaggaaa ttggagacca atagtacagt tgtaagata tcaaacattt gaatttacag
2221 catttttagg tgcatttaaa aagtttttaa aaggtatacc aaaaaaaagc tgotatgctaa
2281 tttgtggacc agcaaataca ggaaagtcatt attttggat gagtttaata cagtttttaa
2341 aagggtgtgt tatatcatgt gtaaatctta aaagtcactt ttggttgcag ccattatcag
2401 atgcaaaaaat aggaatgata gatgatgtaa cgccaataag ttggacatat atagatgatt
2461 acatgagaaa tgcgttagat ggaatgaaa tttcaataga tbtgaaacat agggcattag
2521 tgcaattaaa atgtccacca ctgcttctta cctcaaacac aaatgcaggc acagactcta
2581 gatggccata tttacatagt agattaacag tatttgaatt taaaaatcca ttcccatttg
2641 atgaaaatgg taacccagtg tatgtaataa atgatgaaaa ttggaaatcc tttttctcaa
2701 ggacgtggtg caaatagat ttaatagagg aagaggacaa ggaaaacat ggaggaaata
2761 tcagcacgtt taaatgcagt gcaggagaaa atactagatc tttacgaagc tgataaaact
2821 gatttaccat cacaaattga acattggaac ctgatacgc tggagtggtc tttattttat

HPV 33 F (SEQ ID NO: 3) 5'-cagaa gatgaggatg aaacagcag-3'
SEQ ID NO: 49: 5'-agacagcggatgatggcaatac-3'
SEQ ID NO: 50: 5'-gtattgccatatccgctgtct-3'
SEQ ID NO: 36: 5'-aagcgaagt-3'
SEQ ID NO: 26) 5'-actttcgctt-3'
SEQ ID NO: 34) 5'-aaacgaaagt-3'
SEQ ID NO: 25) 5'-actttcgttt-3'

```

ES 2 684 746 T3

Figura 5D.

HPV 31 E1 (SEQ ID NO: 51)

```

862          aatggctgat ccagcaggta cagatgggga ggggacggga
901 tgcaatggtt ggttttatgt agaagcagta attgacagac agacagggga caacatttca
961 gacgacgaaa atgaagacag tagtgatact ggggaggata tggttgactt tattgacaat
1021 tgtaatgtat acaacaatca ggcagaagca gagacagcac aggcattggt tcatgacacag
1081 gaagcggagg aacatgcaga ggctgtgcaag gttctaaaac gaaagtatgt aggtagtccct
1141 ttaagtgata ttagtagttg tgtggattat aatattagtc cacggttaaa agctatatgc
1201 atagaaaata acagtaaaac agcaaaacga agactttttg aacttccaga cagcgggtat
1261 ggcaatactg aagtgggaagc gcagcagatg gtacaggtag aggagcaaca aacaacatta
1321 agttgtaatg gtagtgacgg gacacatagt gaacgagaca atgaaactcc aacacgtaat
1381 atattgcaag tgttaaaaaac tagcaatggt aaagctgcta tgttaggtaa atttaaagaa
1441 ttatatggtg taagttttat ggaactaatt aggccatttc aaagcaataa aagcacatgt
1501 gctgattggt gtgtagctgc gtttggagtt acaggtacag ttgcagaagg atttaaaacc
1561 ctattgcaac catattgttt gtattgcat ttacaaagtt tagcatgttc ctggggcatg
1621 gttatgttaa tgcttgtaag atttaaatgt gcaaaaaata gaataacaat tgaaaaatta
1681 ttgaaaaagt tattgtgtat atctacaaat tgtatgttaa ttcagccacc caaattacgt
1741 agtacagctg cagcattata ttggtacaga acaggaatgt caaacattag tgatgtatat
1801 ggtgaaacac cagaatggat agaaagacaa acagtattac agcatagttt taatgacaca
1861 acatttgatt tgtcccaaat ggtacaatgg gcatatgaca atgatgttat ggatgatagt
1921 gaaattgcct atagatatgc acaattagct gacagtgata gtaatgcatg tgcattttta
1981 aaaagtaatt cgcaggcaaa aatagtttaa gattgtggaa caatgtgtag acattataaa
2041 cgagcagaaa aacgacaaat gtctatggga cagtggatta aaagtagatg tgacaaagtt
2101 agtgacgaag gtgactggag ggacatagta aagtttttta gatatcaaca aatagaattt
2161 gtgtcathtt tatctgcatt aaagctgttt ttaaaaggag tgccaaagaa aaactgtatt
2221 ttaatacatg gtgcacctaa tacaggtaaa tcatattttg gaatgagcct tatgagcctc
2281 ttacaaggat gtataatatc atatgcaaat tcaaaaagtc atttttggtt acaaccactg
2341 gctgatgcta aaataggcat gttagatgat gctacaacgc catggtggca ttatatagac
2401 aattacctac gaaatgcact agatggcaac cctgtatcta tagatgtaaa gcataaagct
2461 ttaatgcagt taaaatgtcc tcctttattg attacatcta atataaatgc aggtaaggat
2521 gacagatggc catacctaca tagcagacta gtggttttta catttccaaa tccatttcca
2581 tttgacaaaa acggaaatcc agtatatgaa ttaagtgata aaaactggaa atcctttttc
2641 tcaaggacgt ggtgcagatt aaatttgac gaggaagagg acaaagaaaa cgatggagac
2701 tctttctcaa cgtttaaatg tgtgtcagga caaaatatta gaacattatg a

```

HPV 31 F (SEQ ID NO: 4): 5'-gaggaacatgcagaggctgt-3'

SEQ ID NO: 45: 5'-agacagcgggtatggcaatac-3'

SEQ ID NO: 14: 5'-gtattgccataccogctgtct-3'

SEQ ID NO: 34: 5'-aaacgaaagt-3'

SEQ ID NO: 25: 5'-actttcgttt-3'

Figura 5E.

HPV 35 E1 (SEQ ID NO: 52)

```

868                               atg gctgatcctg caggtacaga tgaaggggag
901 gggacgggat gtaatggatg gttttttgta gaagcagtag ttagtagacg tacgggggat
961 ccagtgtcag aggacgaaaa tgaagatgac tgtgacaggg gggaggatat ggtggacttt
1021 ataaatgata cagatatatt aaacatacag gcagaaacag agacagcaca agcattatct
1081 catgcacagg aggagcaaac acacaaagag gctgtacagg tcctaaaacg aaagtatgctt
1141 agtagtccac ttagcagcgt gagcttatgt gttaataata acataagtcc acgtttaaaa
1201 gctatttgca ttgaaaataa aaatacagca gcaaagcgac gattatttga actaccagac
1261 agcggttatg gcaattctga agtggaaata cagcagatac aacaggtaga ggggcatgat
1321 acagttgaac aatgtagtat gggcagtggt gatagtataa cctctagtag cgatgaaaga
1381 catgaagaga ctccaacgag agacataata caaatactaa aatgtagtaa tgcaaacgca
1441 gctatggttg ctaaaatata agacctatct ggtattagtt ttacagaact tattagacca
1501 ttaagagtgt ataaatccac atgtacagat tgggtgtgtgg cgcatttgg aatagcccca
1561 agtgtggtgg aaagttaaa aacattaatt aaacatatt gtttatatgt acatatacaa
1621 tgtttatcgt gttcatgggg tatggtaatt ctagcattat tacgatttaa atgtgcaaaa
1681 aacagaacaa caattgaaaa actattatca aaattgctat gtatttcagc tgcaagtatg
1741 ctaatacaac caccaaaatt acgtagtacc ccagctgctg tatattgggt taaaacagca
1801 atgtcaata ttagtgaggt tgatggagaa acaccagaat ggattcaaa acaaacagta
1861 ttacagcata gttttaatga tgcaatattt gacctatctg aatgggtaca atggcatat
1921 gacaatgatt ttatagatga tagtgatata gcatataaat atgcacaatt ggcagaaact
1981 aatagtaatg catgtgcttt tttaaaaagt aattcgcaag ctaaaattgt aaaagattgt
2041 gcaacaatgt gtagacatta taaacgagct gaaaaaagag aatgacaat gtcacagtgg
2101 attaaaaggc gatgtgaaaa ggtggacgat gacggtgact ggagggacat agtacgattt
2161 ttaagatata aacaagtaga ttttctggca tttttatctg cactaaaaaa tttttacat
2221 ggtgtgccta aaaaaaattg catacttata tatggagcac caaacacagg taaatcatta
2281 tttggaatga gtctaagca tttcttacia ggagctatta tatcctatgt aaattctaaa
2341 agccattttt ggttcagacc attatatgat gccaaaatag ctatggtaga tgatgctaca
2401 tcgccatggt gggcatatat agaccaatat ttaagaaatg cactagatgg aaatcctatt
2461 tcattagatg taaagcataa agcattagtg caattaaaat gccaccttt acttattaca
2521 tcaaatataa atgcaggcaa agatgacagg tggccatact tacatagcag ggtagtgttc
2581 tttacatttc acaatgaatt cccatttgat aaaaatggaa acccagtgtg tgggcttaat
2641 gataaaaact gaaaatcctt tttctcaagg acgtggtgca gattaaattt gcacagggaa
2701 gaggacaaa gaaaalgalg agacgclllc ccagcgllla aglglglglc aggacaaaal
2761 actagaacat tacgagactg a

```

HPV 35 F (SEQ ID NO: 5): 5'-atgcacaggaggagcaaca-3'

```

SEQ ID NO: 53: 5'-agacagcgggttatggcaattc-3'
SEQ ID NO: 54: 5'-gaattgccataaccgctgtca-3'
SEQ ID NO: 45: 5'-agacagcgggtatggcaatac-3'
SEQ ID NO: 14: 5'-gtattgccatacccgctgtct-3'
SEQ ID NO: 34: 5'-aaacgaaagt-3'
SEQ ID NO: 25: 5'-actttcgttt-3'

```

ES 2 684 746 T3

Figura 5F.

HPV 39 E1 (SEQ ID NO: 55)

```

928          tg gccaatcgtg aaggtacaga cggggatggg
961 tcgggatgta acggatggtt tctagtagacag gcaatagtag ataaacaaac aggcgacaca
1021 gtgtcggagg atgaggatga aaatgcaaca gatacagggt cagacttggc agactttatt
1081 gatgattcca cagatatttg tgtacaggca gagcgtgaga cagcacaggt acttttacat
1141 atgcaagagg cccaaagggg tgcacaagca gtgctgcct taaaacgaaa gttatacagac
1201 agcagtggcg aactagacc gtatggaaa aaagtaggca ggaataccag ggaacacta
1261 caggaaatth cattaaatgt aagcagtacg caggcaacac aaacgggtga ttccgtgcca
1321 gacagcggat atggcaatat ggaagtggaa acagctgaag tggaggaggt aactgtagca
1381 actaatacaa atgggatgac tgaaggggaa catggcggca gtgtacggga ggagtgcagt
1441 agtgtggata gtgctataga tagtgaaaac caggatccca aatctccaac tgcacaat
1501 aaattattgt tacaatccaa taacaaaaag gctgcaatgc taacacaatt taaagaacaa
1561 tatggactat cctttactga cctggtagct acgtttaaaa gtgataaaac aacatgtaca
1621 gactgggtgg cagccatatt tggagtacat ccaactattg cagaaggatt taaaacatta
1681 atcaacaaat atgccttata tacacatata caaagcttag acacaaaaa aggagtacta
1741 attttaaatgc taataagata tacatgtgga aaaaataggg ttactgtagg aaagggatta
1801 agtacattgt tacatgttcc agaaagtgt atgcttctgg agcctcctaa actgcgacgc
1861 cctgtagcag cactatattg gtatcgaca ggtatatcca atattagtg ggtaacaggg
1921 gatacgccag aatggataca acgattaact gttatacaac atggaataga tgatagtga
1981 tttgacctat cggacatggt acaatgggca tttgacaatg aatatactga tgaaagtgc
2041 atagcattta attatgcaat gttagcagat tgtaacagta atgctgcagc ctttttaaaa
2101 agtaactgcc aggcaaaata tgtaaaagat tegtcaacaa tegttaacaa ttacaagcga
2161 gcacaaaaaa ggcaaatgac catgtctcaa tggataaaat ttaggtgtag taaatgtgat
2221 gaagcggggg actggagacc catagtacaa ttcttaagat atcaaggaat agaatttata
2281 tcctttttat gtgcattaaa ggaattttta aagggtactc ccaaaaaaaa ctgtatagtt
2341 atatatggac ctgcgaatac aggaaagtca catttttgta tgagccttat gcatttttta
2401 cagggcacag ttatttcata tgtaaaactcc accgacct tttggctaga accacttgca
2461 gatgcaaaa tagcaatggt agatgatgca accggtacct gctggctata tttcgataat
2521 tatatgagaa atgcattaga tgggtatgca ataagttag ataggaata taaaagtta
2581 ctacaaatga aatgtccacc attattaata acctcaata ccaatcctgt ggaagacgat
2641 aggtggccat atttacgtag taggctaaca gtgtttaa attcctaatgc atttccattt
2701 gacaaaaaca ggaatccagt gtacacaatc aatgataaaa actggaaatg ttttttgaa
2761 aagacttggg gcagattaga cttgcagcag gacgaggatg aaggagacaa tgatgaaaac
2821 actttcacia cgtttaaatg tgttacagga caaaatacta gaatactatg a

```

HPV 39F (SEQ ID NO: 6): 5'-gtgagacagcacaggtacttttac-3'

- SEQ ID NO: 49: 5'-agacagcggaatatggcaatac-3'
- SEQ ID NO: 50: 5'-gtattgccatatccgctgtct-3'
- SEQ ID NO: 34: 5'-aaacgaaagt-3'
- SEQ ID NO: 25: 5'-actttcgttt-3'

ES 2 684 746 T3

Figura 5G.

HPV 45 E1 (SEQ ID NO: 56)

```

914          tggcgg atccagaagg taccgacggg gagggaacgg ggtgtaatgg
961 ctggttcttt gtagaaacaa ttgtagagaa aaaaacaggg gatgtaatat cagatgatga
1021 ggatgaaact gcaacagata cagggctcggg tatggtagat tttattgaca cacaattatc
1081 ctttgtgaa caggcagagc aagagacagc acaggcattg ttccatgcg aggaagtca
1141 gaatgatgca caggtggtgc atcttttaa aa acgaaagttt gcaggaggca gcaaggaaaa
1201 cagtccatta ggggagcagc taagtgtgga tacggatcta agtccacggg tacaagaaat
1261 ttcattaaat agtgggcaca aaaaagcaaa acgacggttg tttacaata t cagatagtgg
1321 ctatggctgt tctgaagtgg aagctgcaga gactcaggta actgtaaaaca ctaatgcgga
1381 aaatggcggc agtgtacata gtacacaaag tagtggggg gatagtagtg acaatgcaga
1441 aaatgtagat ccgattgca gtattacaga actaaaggag ctattacaag caagtaacaa
1501 aaaggctgca atgctggcag tatttaaaga catatatggg ctgtcattta cggatttggg
1561 tagaaatfff aaaagtgata aaacaacatg tacagattgg gtaatggcta ttttggagt
1621 taatccaacg gtacgagaag gctttaaac attaatfata ccagcaacgt tatacgcca
1681 tatccaatgt tttagattgta aatggggagt attaatatta gctttattaa gatataaatg
1741 tggcaaaaat agactaactg ttgcaaaagg cttaagcaca ttggtgcacg tacctgaaac
1801 atgtatgta attgaaccac caaaattgag aagtatggt gcagcattat actggtatag
1861 aacaggata tccaatatta gtgaagtaag tggagacaca cctgagtgga tacaagact
1921 gacaattatt caacatggta ttgacgatag taattttgat ttgtcagaca tgggtcaatg
1981 ggcatttgat aatgacctta cagatgaaag tgatatggca tttcaatatg cccaattagc
2041 agactgcaac agtaatgcag ctgcattttt aaaaagtaac tgccaagcca aatattfata
2101 agattgtgct gtaatgtgta gacattataa aagagcaca aaacgcaaa tgaatatgct
2161 tcaatggatt aaatatagat gttccaaaat agatgaaggt ggggattgga gacctatag
2221 acaattccta agatatcagg gagtagaatt tattagcttt ttaagggcac taaaggaatt
2281 tctfataagga acacaaaaaa aaaattgtat actgttatat ggacctgca atacaggaaa
2341 atcgatfff ggaatgagtt ttatacattt cctacaaggt gcaataatat ctttgtaaa
2401 ttcaaacagc ctttttggg tagaacggtt agcagatact aaggtagcca tgttgatga
2461 tgccacacac acgtgttggg catattttga taattatag agaaatgcat tagatggtaa
2521 tcctataagt atagacagaa agcataaacc attattacag ctaaaatgct ctccaatcct
2581 attaacatcc aatattgatc cagcaaaaaga taataaatgg ccatatttag aaagtagggt
2641 gacggtatff acatttccac atgcatttcc atttgataaa aatggtaatc cagtatatga
2701 aataaatgat aaaaattgga aatgtttttt tgaaaggaca tggccagat tagatttga
2761 cgaggacgat gaagatgcag acaccgaagg aatcccttc ggaacgttta agtgcgttac
2821 aggacaaaat actagaccac tatga

```

HPV 45 F (SEQ ID NO: 7): 5'-ccatgcgccaggaagtccag-3'
 SEQ ID NO: 47: 5'-tcagatagtggctatggctgtt-3'
 HPV 18/45 R (SEQ ID NO: 15): 5'-aacagccaatagccactatctga-3'
 SEQ ID NO: 34: 5'-aaacgaaagt-3'
 SEQ ID NO: 25: 5'-actttcgttt-3'

Figura 5H

HPV 51 E1 (SEQ ID NO: 57)

841 ttgcccgtgt tgtgcgaaca actagcaacg gcgatggact gtgaaggtag agaggatgag
 901 ggggcggggt gtaatgggtg gttttttgtt gaagcaatag tagaaaaaaaa aacaggagat
 961 aatgtttcgg atgatgagga tgaaaatgca gatgatacag gatctgattt aataaacttt
 1021 atagatagtg aaactagtat ttgcagtcag gcggaacagg agacagcacg ggcgttgttt
 1081 caggccaag aattacaggc aa**acaaagag gctgtgcac** **agttaaaacg aaagt**ttcta
 1141 gtcagcccgc gaagcagccc attaggagac attacaatc aaaaacaacac acacagccat
 1201 agtcaggcaa acgagtcaca agttaaaagg agatt**actgg acagttatcc ggacagc**gga
 1261 tatggcaata cacaagtggg aactgtggaa gcaacgttgc aggtagatgg gcaacatggc
 1321 ggttcacaga acagtgtgtg tagtagcggg gggggcagtg ttatggatgt ggaacaaca
 1381 gaaagctgtg caaatgtaga actaaacagt atatgtgaag tattaanaag cagtaatgca
 1441 aaagcaacgt taatggcaaa atttaaaagag ttgtatggta ttagtataa tgagtggta
 1501 cgggtgttta aaagtataa aacatgttgt atagattggg tttgtgcatt gtttggcgtt
 1561 tccccaatgg tagcagaaaa tttaaaaaca ctaattaagc cattttgcat gtactaccat
 1621 atacaatggt tatcatgtga ttggggcacc attgtattaa tgctaattag gttttcatgt
 1681 gcaaaaaaca gaacaacaat tgctaagtgt ttaagtacat tagtaaatat cccacaatca
 1741 caaatgttta tagaaccacc aaaattacgt agtacacctg tggcattata tttttataga
 1801 acaggcatat caaacattag caatacatat ggagagacac ctgaatggat tacacgaaa
 1861 acgcaactac aacatagttt tgaggatagt acctttgaat tatcacaat ggtgcaatgg
 1921 gcatttgacc atgaagtatt agatgatagt gaaatagcat ttcattatgc acaattagca
 1981 gatatagata gtaatgctgc agcgttttta aagagtaatt gccaagcaaa atatgtaaaa
 2041 gattgtggga ccatggcacg gcattacaaa cgagcacaaa gaaaatcatt atctatgtca
 2101 gcctggataa ggtatagatg tgatagagca aaggatggag gcaactggag agaaattgct
 2161 aaatttttaa gatatcaagg tgtaaacttt atgtccttta ttcaaatggt taaacagttt
 2221 ttaaaaggaa caccaaaaca caattgcata gtcatatatg gccacccaaa cacaggcaag
 2281 tcattatttg caatgagcct aatgaagttt atgcaagggt ccattatttc atatgtaaac
 2341 tctggtagtc atttttgggt acagccacta gaggatgcta aaatagcatt gttagatgat
 2401 gctacgtatg ggtgttgac atatattgat cagtatttaa gaaactttt agatggtaat
 2461 ccatgtagta tagatagaaa acataggagt ttaatacaat tagtatgtcc accattacta
 2521 ataacgtcaa acataaatcc acaagaggat gcaaacctaa tgtatttaca tacaagggta
 2581 acagtattaa agtttttaaa tacatttcca tttgataaca atgggaatgc tgtgtataca

HPV 51 F (SEQ ID NO: 8): 5'-acaaagaggctgtgcacacag-3'

SEQ ID NO: 58: 5'-actggacagttatccggacag-3'

HPV 51 R (SEQ ID NO: 16): 5'-ctgtccggataactgtccagt-3'

SEQ ID NO: 34: 5'-aaacgaaagt-3'

SEQ ID NO: 25: 5'-actttcgttt-3'

ES 2 684 746 T3

Figura 5I.

HPV 52 E1 (SEQ ID NO: 59)

864 tggagg accctgaagg tacagagggc gaaagggagg
 901 gatgtacagg ctggtttgaa gtaaaggcaa taatagaaaa acaaacagga gataacatTT
 961 cagaggacga ggatgaaat gcatatgata gtggaacaga tctaatagat tttatagatg
 1021 attcaaatat aaataatgaa caggcagaac atgaggcagc cggggcattg tttaatgcac
 1081 aggaagggga ggatgattta catgctgtgt ctgcagtaa acgaaagttt acaagcagtc
 1141 cggaaaagtgc tgggcaagat ggtgtagaaa aacatggtag tcccggtgca aaacacatTT
 1201 gtgtaaatac agagtgtgTT ttacaaaaac gcaaaccatg tcacgtagaa gacagcggct
 1261 atggcaatag tgaagtggaa gcgcagcaga tggcagacca ggtagacggg caaaatggcg
 1321 actggcaaag taacagtagt caatcaagtG gggTgggggc tagtaattca gatgtaagtt
 1381 gtactagtat agaggacaat gaggaaaaata gtaatagaac gctaaaaagc atacaaaata
 1441 ttatgtgcga aaatagcata aaaacaacgg tattatttaa atttaaagaa acatatggTg
 1501 ttagctttat ggaattagta agaccattta aaagtaatag aagtagttgt acagattggT
 1561 gtattatagg aatgggagta acaccatcag ttgcagaagg attaaaagta ttaatacagc
 1621 cctatagcat atatgcccat ttgcaatgTT taacatgtga cagagggcgtg cttatactgc
 1681 tgctaattag gtttaaattgt ggaaaaaaca gattaacagt gtccaaacta atgtcacagc
 1741 tgttaaatat accagaaaaca catatggtaa tagaaccacc aaaattacga agtgctacct
 1801 gtgcattata ttggtataga acaggtttgt ctaatattag tgaggatat ggtaccacc
 1861 cagaatggat agaacaacaa acagtattac agcatagcTT tgacaatagc atatttgatt
 1921 ttggagaaat ggtgcaatgg gcatatgatc atgatataac agatgatagt gacatagcat
 1981 ataaatatgc acagtttagca gatgtaaata gcaatgctgc agcattccta aaaagcaatt
 2041 cgcaagcaaa aatagtaaag gactgtgcaa ccatgtgtag acattataaa cgggcagaaa
 2101 gaaaacatat gaatattgga caatggatac agtatagatg tgatagaata gatgatggTg
 2161 gagattggag gcctatagta agatttttaa gatatcaaga catagaatTT acagcctTTT
 2221 tagacgcatt taaaaaattt ttaaaaggta tacctaaaaa aaattgtTTa gtatttatg
 2281 gacctgcaa cacaggaaaa tcatattttgT gaatgagttt aattaggttc ttaagtggat
 2341 gtgtaatatc ctatgtaaac tcaaaaagcc atTTTtggtc acaaccatta acagatgcaa
 2401 aagtgggtat gatagatgat gtaaacaccta tatgTtggtc atatatagat gattatatga
 2461 gaaatgcact ggatggaaat gatatatcag tagatgtaaa gcatagagcc ttagtacaaa
 2521 taaaatgccc accattaatt ttaacaacaa atacaaatgc aggaacagat cctaggtggc
 2581 catatttaca tagtagattg gttgtgtttc atttcaaaaa cccatttcca tttgatgaaa
 2641 atggcaatcc catatatgaa attaacaacg aaaattggaa atcctTTTTc tcaaggacgt
 2701 ggtgcaaatt agatttaata caggaagagg acaaggaaaa cgatggagtc gataccggca
 2761 cgtttaaatg cagtgcagga aaaaatacta gatctatagc aagctga

HPV 52 F (SEQ ID NO: 9): 5'-gaaggggaggatgatttacatgc-3'

SEQ ID NO: 60: 5'-agacagcggcTatggcaatag
 SEQ ID NO: 61: 5'-ctattgccatagccgctgtct-3'

SEQ ID NO: 34: 5'-aaacgaaagt-3'
 SEQ ID NO: 25: 5'-actttcgttt-3'

ES 2 684 746 T3

Figura 5J.

HPV 56 E1 (SEQ ID NO: 62)

895 atggcg

901 tcacctgaag gtacagatgg ggaggggaag ggatgttgg gatggtttga agtagaggca

961 attgtagaaa aaaaaacagg agataaaaata tcagatgatg aaagtgacga ggaggatgaa

1021 atagatacag atttagatgg atttatagac gattcatata tacaaaatat acaggcagac

1081 agagagacag ctcaacaatt gttgcaagta caaacagcac atgcagataa acagacgttg

1141 caaaaactaa aacgaaagta tatagctagt ccattaagtg atattagtaa tcagcaaaact

1201 gtgtgccggg aaggagtaaa acggaggcct attttatcag acctacaaga cagcgggtat

1261 ggcaatacat tggaaactct ggaaacacca gaacaggtag atgaagaggt acagggacgt

1321 ggggtgcggg atacacaaaa tggaggctca caaacagta cctatagtaa caatagttag

1381 gactctgtaa tacatatgga tattgataga aacaatgaaa cgccaacaca acaattgcag

1441 gacttgttta aaagtagcaa tttacaaggt aaattatatt ataaatttaa agaagtgtat

1501 ggtattccat tttcagaatt ggtgctgacg tttaaaagt atagtacatg ttgcaatgat

1561 tggatatgtg ctatatttgg tgttaatgaa acattagccg aggcactaaa aactataata

1621 aaaccacact gtatgtatta tcatatgcaa tgtttaacat gtacatgggg ggttatagta

1681 atgatgctaa ttagatatac atgtggcaaa aacagaaaaa caattgcaaa agcattaagc

1741 tcaatattaa atgtaccaca ggagcaaatg ttaattcaac caccaaaaat acgaagtcc

1801 gctgtagctt tatatTTTTA taaaacagca atgtcaata ttagtgatgt gtatggagac

1861 acaccagaat ggatacaaaG acaaacacaa ttgcaacaca gtttacagga tagtcaattt

1921 gaattatcta aaatgggtgca gtgggcattt gataatgaag taacagatga tagccaaatt

1981 gcgTTTTcaat atgcacaatt agcagatgta gacagcaatg cacaagcctt tttaaaaagc

2041 aatatgcagg caaaatattg aaaggattgt ggaataatgt gtagacatta taaaagggca

2101 caacagcaac aaatgaatat gtgccagtgg ataaagcaca tatgtagtaa aacagatgaa

2161 ggggggtgatt ggaaacccat tgtacaattt ttaagatata aaggggtcga tttcatttca

2221 tttctaagtt actttaaatt atttctacaa ggaacaccta aacataactg tttggtaact

2281 tgtggaccgc caaatacagg taaatcatgc tttgctatga gtcttataaa gttttttcaa

2341 gggctctgtca tttcatttgt gaattcacia agccactttt ggtgagcc attagacaat

2401 gctaaacttg ggtgttggga tgatgcaaca gaaatatgtt ggaaatata agacgattat

2461 ttaaggaatt tggtagatgg aaatcctata agtttagata gaaaacataa acaattagta

2521 caaataaaat gtccaccatt actaattaca accaatataa atcctatgct agatgctaaa

2581 ttacgatatt tacacagtag aatgttagtg tttcagttt aaaaatccatt tccattagat

2641 aataatggta atcctgtata tgaattaaat aatgtaaact ggaaatggtt ctttacaagg

2701 acgtgtcca gattaaatt ggataacgac gaggacaaag aaaacaatgg agacgctttc

2761 ccaacgttta aatgtgtgcc agaacaaaat actagactgt tttga

HPV 56/66 F (SEQ ID NO: 10): 5'-gcaagtacaaacagcacatgc-3'

SEQ ID NO: 45: 5'-agacagcgggtatggcaatac-3'

HPV 16/31/33/35/39/52/56/58/66R SEQ ID NO: 14: 5'-gtattgccataccogtgtct-3'

SEQ ID NO: 34: 5'-aaacgaaagt-3'

SEQ ID NO: 25 5'-actttcgttt-3'

Figura 5K.

HPV 66 E1 (SEQ ID NO: 63)

895
 901 tcacctgaag gtacaaatgg ggaggggacg ggatgttgtg gatggtttca ggtagaagca atggca
 961 attgtagaaa gaaaaacggg ggatacaata tcagatgatg aaagcgagga ggagaatgaa
 1021 acagatacag atttagatgg atttatagac aatacactta taacaatac acaggaagac
 1081 agggagacag ctcaacaatt attgcaagta caaacagcac atgcagatgc acagacgttg
 1141 caaaaactaa aacgaaagta tataggtagt cccttaagtg atattagtaa tcagcaaaact
 1201 gtgtaccggg aggaagtaaa acgaaggcta atattatcag aagacagtgg gtatggcaat
 1261 acattggaaa cattggaaaac atcacaacag gtagaatacg aaaagggaaa tgggtgcggg
 1321 agctcacaaa atggaggctc gcaaaacagt aactgtagtg agcactcggg ggtaaatatg
 1381 gatatagata caaatatgga aacaccaaca caccaattgc aggaactatt taaaagtagt
 1441 aacgcacaag gaagattaca ttttaaattt aaagaagtgt atggagtgcc atatacagag
 1501 ttgggtgcgaa catttaaaag cgatagtaca tgttgtaacg attggatatg tgcaatattt
 1561 ggtgttaatg aaacattagc agaagcgtta aaaactatac taaaaccaca atgtgtgtac
 1621 tatcatatgc aatgcctaac atgttcatgg ggggtaattg taatgatgct aattagatat
 1681 atatgtggaa aaaacagaaa aacaattaca aaatcgctaa gctcaatttt aaatgtacca
 1741 caagagcaaa tgttaattca accaccaaaa ctacgaagtc ctgctgtggc atttatattt
 1801 tataaaacag caatgtcaaa tattagttag gtgtatgggg aaacaccaga atggatacaa
 1861 agacagacac aattgcaaca cagtttaca gacaatcaat ttgaattgtc taaaatggta
 1921 cagtgggcat ttgataatga cgtaacagat gatagccaaa ttgccttttt atatgcacaa
 1981 ctagcggaca tagatagtaa tgcacaagca tttttagaaa gtaatatgca agcaaaat
 2041 gtaaaggatt gtggaataat gtgtagacat tataaaaggg cacagcaaca gcaaatgaa
 2101 atgtgccagt ggataaagca tatatgtagt aaagtagatg aagggggtga ttggaaacc
 2161 attgacgaat ttttacgata tcaaggggtc gacttcattt catttttaag ttatttttaa
 2221 ttatttttac aaggcacgcc taaacataat tgtttgttac tgtgtggacc accaaataca
 2281 ggtaaatcat gttttgctat gagccttata aattttttcc aagggtcagt catttcattt
 2341 gttaattcac aaagccactt ttggttacag ccactagaca atgccaattt agggttgctg
 2401 gatgatgcaa cagatacgtg ttggagatat atagatgatt atctaagaaa tttattagat
 2461 gggaaatcca taagtttaga taggaaacat aaacaattag tacaataaaa atgtcctcca
 2521 gtcattatta caactaatgt aaatcctatg caagatgcaa aattaagata tctacacagt
 2581 agaatttcag tgtttaagtt tgaaaaatcca tttccattag ataacaatgg taatcctgtg
 2641 tatgaattga gtaatgtaaa ttggaaatgt ttttttgaaa ggacatgggtc cagattaat
 2701 tcggataacg acgaggacaa agaaaacaat ggagactcta tcccaacggt tagatgcgtg
 2761 ccagaacaaa atactaggct gttatga

HPV 56/66 F (SEQ ID NO: 10): 5'-gcaagtacaaacagcacatgc-3'

SEQ ID NO: 64: 5'-agacagtggttatggcaatac-3'

SEQ ID NO: 65: 5'-gtattgccatacccaactgtct-3'

SEQ ID NO: 34: 5'-aaacgaaagt-3'

SEQ ID NO: 25: 5'-actttcgttt-3'.

Figura 5L.

HPV 58 E1 (SEQ ID NO: 66)

```

883                                     atggatga cctgaaggt
901 acaaacgggg taggggctgg ctgtactggc tggtttgagg tagaagcagt aatagaacga
961 agaacaggag ataatatctc agatgatgag gacgaaacag cagacgatag tggtagacag
1021 ttaatagagt ttatagatga ttcagtagaa agtactacac aggcagaagc agaggcagcc
1081 cgagcgttgt ttaatgtaca ggaaggggtg gacgatataa atgctgtgtg tgcactaaa
1141 cgaaagtgtg cagcatgctc agaaagtgtc gtagaggact gtgtggaccg ggccgcaaat
1201 gtgtgtgtat cgtggaaata taaaaataaa gaatgcacac acagaaaacg aaaaattatt
1261 gagctagaag acagcggata tggcaatact gaagtggaaa ctgagcagat ggcaaccag
1321 gtagaaaacc aaaatggcga cgcagactta aatgactcgc agtctagtgg ggtgggggct
1381 agttcagatg taagcagtga aacggatgta gacagtgtga atactgttcc attacaaaat
1441 attagtaata tttacataa cagtaatact aaagcaacgc tattatataa attcaaagaa
1501 gcttatggag taagttttat ggaattagt agaccattta aaagtgataa aacaagctgt
1561 acagattggg gtataacagg gtatggaata agtccctccg tagcagaaag tttaaaagta
1621 ctaattaaac agcacagtat atatacacac ctacaatgtt taacgtgtga cagaggaatt
1681 atattattat tgttaattag atttaaatgt agcaaaaata gattaactgt ggcaaaatta
1741 atgagtaatt tactatcaat tcctgaaaca tgtatgatta ttgagccacc aaaattacga
1801 agtcaagcat gtgccttata ttggtttaga acagcaatgt caaatataag tgatgtgcaa
1861 gggacaacac cagaatggat agatagatta acagtgttac agcatagctt taatgatgat
1921 atatttgatt taagtgaaat gatacaatgg gcatatgata atgacattac agatgatagt
1981 gacattgcat ataaatgtc acagtttagc gatgttaata gtaatgcagc agcattttta
2041 agaagcaatg cacaagcaaa aatagtaaaa gactgtggcg ttatgtgcag acattataaa
2101 agagcagaaa agcgtggtat gacaatggga caatggatac aaagttagtg tgaaaaaaca
2161 aatgatggag gtaattggag accaatagta caatttttaa gatatcaaaa tattgaattt
2221 acagcatttt tagttgcatt taaacagttt ttacaagggtg taccaaaaaa aagttgtatg
2281 ttactgtgtg gccagcaaaa tacagggaaa tcataatttg gaatgagttt aatacatttc
2341 ttaaaaggat gcattatttc atatgtaaat tccaaaagtc atttttggtt gcagccatta
2401 tcagatgcta aactaggtat gatagatgat gtaacagcca taagctggac atatatagat
2461 gattatatga gaaatgcatt agatggtaac gacatttcaa tagatgtaaa acatagggca
2521 ttagtacaat taaaatgtcc accattaata attacctcaa atacaaatgc aggcгааagat
2581 tcacgatggc cataattgca cagtagacta acagtatttg aatttaacaa tccatttcca
2641 tttgatgcaa atggtaatcc agtgtataaa ataatgatg aaaattggaa atcctttttc
2701 tcaaggacgt ggtgcaaatt aggcttaata gaggaagagg acaaggaaaa cgatggagga
2761 aatatcagca cgtttaagtg cagtgcagga caaaatccta gacatatac aagctga
    
```

HPV 58 F (SEQ ID NO: 11): 5'-agcccagcgttgtttaatg-3'

SEQ ID NO: 49: 5'-agacagcggatgatggcaatac-3'

SEQ ID NO: 50: 5'-gtattgccatattccgctgtct-3'

SEQ ID NO: 34: 5'-aaacgaaagt-3'

SEQ ID NO: 25: 5'-actttcgttt-3'

Figura 5M.

HPV 59 E1 (SEQ ID NO: 67)

```

872                               tggccgat tcggaaggta cagatgggga
901 agggacgggg tgcaatggat ggttttttgt gcaggcaata gtagataaaa aaacaggtga
961 caaaatttca gatgacgagg atgaaaatgc aacagataca ggttcagact tggtagactt
1021 tattgatgat accacaacaa tttgtgtaca ggcagagcgc gagacagcac aggccttggt
1081 taatgtgcag gaagcccaaa gggatgcacg ggaaatgcat gttttaaaac gaaagtttgg
1141 gtgcagtata gaaaacagta gtgagaaaagc ggcggcagga acaaaagcta agtcaccatt
1201 acaagaaata tcagttaatg ttaaccaccc aaaagttaaag agaaggttac taacagtgcc
1261 agacagcggc tatggctatt ctgaagtgga aatgctcgag actcaggtaa ccgtggagaa
1321 tactggaat ggggacagca atggcagtggt ttgtagcgac agtcaaatac acggtagcga
1381 cagcagtaac atggatggtg aaaacatagt tccaacatcc cccactaatc aattgttaca
1441 gttattacat agcaaaaaata agaaagcagc tatgtatgca aaatttaaag aattgtatgg
1501 gttatcattt caagatttgg ttaggacatt taaaagtgcac agaactacct gttagcattg
1561 ggtaaccgcc atttttggtg taaatccaac tgtagcagaa ggatttaaaa cattaatata
1621 accctatgtg ctatatgcac atatacaatg tttagattgt gcatggggag tagtaatatt
1681 agcattatta agatataaat gtggaaaaaa tagaataaca gttgcaaaag gacttagcac
1741 attactacat gtaccagata cgtgcatggt aattgaacca cccaaattgc gtagtgggtg
1801 tgcagcatta tattggtaca gaacaggaat gtccaatatt agtgaagtta taggggaaac
1861 gcccgaatgg atacaaagac taacaattat acaacatgga gttgatgata gcgtgtttga
1921 cctgtcagaa atgatacaat gggcgtttga taatgaccta acagatgaaa gtgatattgc
1981 atatgaatat gcattaatag cagatagtaa tagtaacgcc gctgcatttt taaaaagcaa
2041 ctgccaggca aatacctaa aagattgtgc agttatgtgt aggcattata aaagagcaca
2101 aaaaagacaa atgagtatgt cacagtggat aaaatggaga tgtgataaaa tagaagaggg
2161 gggagattgg aaaccatag tacaattttt aagatatcaa ggagtagaat ttataacggt
2221 tttatgtgca ttaaaagatt ttttaaaagg taccctaaaa agaaattgca ttgtgctgtg
2281 tgggccagca aatacaggca agtcataact tggaaatgagc ctgctacatt tcttacaagg
2341 aactgtaatt tcacatgtaa attcaaatag tcacttttgg ctagaacctt taacagatgc
2401 taaattagct atgctagacg atgcaacaga tagttgttgg acatattttg atacatatat
2461 gcgaaatgct ctggatggca atcctataag tgtagataga aagcataggc acctagtaca
2521 aattaaatgt ccaccaatgc ttattacatc aaatacaaat ccagttacag ataacaggtg
2581 gccataccta aatagcagac taatgggtatt taaatttcca aacaaatttc catttgacaa
2641 aatagaaat ccagtatata caattaatga cagaaactgg aaatgttttt ttgaaaggac
2701 gtggtgcaga ttagatttga acgaggaaga ggatgatgca gacagtgatg gacacccttt
2761 cgcagcgttt aagtgtgtta caggatcaaa tattagaaca ttatga

```

HPV 59 F (SEQ ID NO: 12): 5'-ggccttggttaatgtgcaggaag-3'
 SEQ ID NO: 68: 5'-gaaggttamtaacagtgccagaca-3'
 HPV 59 R SEQ ID NO: 17: 5'-tgtctggcactgttaktaaccttc-3'
 SEQ ID NO: 34: 5'-aaacgaaagt-3'
 SEQ ID NO: 25: 5'-actttcgttt-3'

ES 2 684 746 T3

Figura 5N.

HPV 68 E1 (SEQ ID NO: 69)
 824
 841 tacagatggg gacgggacgg ggtgtaacgg atggtttttc gtacaagcaa tagtagataa
 901 aaaacaggt gacacagtct cagaggatga ggatgaaaac gcgacagata cagggttcaga
 961 catggtagat ttcattgatg atgctacaga tatttgtata caggcagagc gtgagacagc
 1021 acaggtactg ttaaatatgc aacaggccca aagggatgca caaacagtgcc gtgccctaaa
 1081 acgaaagtat acagacagta tagaaaagcag ccctttagca aagtogccat tacaggaact
 1141 atcaataaat gtaagcagta cacaggcaag acaaccggcg tatacagtgc cggacagcgg
 1201 ctatggcaat atggaagtgg aaactcactc ggaggttaact gtagcaacta atacaaatgg
 1261 ggcggacggg gaggatgaag gggaaaatgg cgacagcata cgggaggact gtagtagtgt
 1321 agacagtgct atagatagtg aaaaccagga tcctaatca cctactactc aactaaaagt
 1381 attattacaa tgtaataata aaaaagctgc aatgttaaca gaatttaaaa aagtatatgg
 1441 attgtccttt aatgacctag tacgtacatt taaaagtgat aagaccacat gtaccgactg
 1501 ggtagcagca atatttggag taaatccaac cattgcccga ggttttaaaa cactaattaa
 1561 acaatatgca ttatataccc atatacaatg tttagataca aaaaacggaa tattaatatt
 1621 aatgttaata agatataaat gtgggaaaaa tagaataaca gtaggaaaag gattaagtac
 1681 attgttgcac gttccagaca gctgtatgct tttgcagcca ccaaaattgc gtagccctgt
 1741 tgcagcattg tattggtata gaacaggaat atctaataat agtgagggtg gtggagacac
 1801 gccagaatgg ataaaaagat taactataat acaacatgga atagatgata gtgtatttga
 1861 tctatcagac atggtacaat gggcatttga taatgagtta acagatgaaa gtgatatagc
 1921 attttcatat gctatggtgg cagattgtaa tagtaatgct gcagcgtttt taaaaagcaa
 1981 ctgccaaagca aaatatgtaa aagattgtgc aacaatgtgt agacattaca aacgggcaca
 2041 aaaacgacaa atgtcaatgc cgcaatggat taaattcaga tgcagtaaat gtgatgaagg
 2101 tgggtgattgg cgaccaattg tacagttttt aagatatcag gggctagaat tcataacatt
 2161 cttatgtgca ttaaaagatt ttttaaaagg cacgccaaaa cgtaattgta tagttataca
 2221 tggggccacca aatactggca agtcatattt ttgcatgagt cttatacatt tcttgcaagg
 2281 cacaataatt tcatatgtaa attcagctag tcacttttgg ttagagccac ttgcagatgc
 2341 aaaaatagcc atgttagatg acgcaacagc tacatgttgg tcatattttg ataattacat
 2401 gagaaatgca ttagatggta acccaataag tttagataga aaacacagac acctaataca
 2461 aataaaatgt ccaccaatgc taataacatc aaataactaac cctgtggaag acaatagggtg
 2521 gccgtattta catagcagac taactgtatt taaatttct aatgcatttc catttgacca
 2581 aaacaggaac ccagtgtata caatgaatga taaaactgg aatgttttt ttgaaaagac
 2641 ttggtgcaaa ttagacttgc agcaggacga ggatgaagga gacaatgatg aaaacacttt
 2701 cccaacgttt aatgtgtta caggagaaaa tattagaaca ttatga

HPV 68 F (SEQ ID NO: 13): 5'-aaaacaggtgacacagtctcag-3'
 SEQ ID NO: 70: 5'-agcaaagtcgccattacagga-3'
 HPV 68 R (SEQ ID NO: 18): 5'-tcctgtaatggcgacttttgcct-3'
 SEQ ID NO: 34: 5'-aaacgaaagt-3'
 SEQ ID NO: 25: 5'-actttcgttt-3'

Figura 6A.

HPV 16 E1 (SEQ ID NO: 44)

```

865          atggct gatcctgcag gtaccaatgg ggaagagggt
901 acgggatgta atggatggtt ttatgtagag gctgtagtgg aaaaaaaaaac aggggatgct
961 atatcagatg acgagaacga aatgacagt gatacagggt aagatttggg agattttata
1021 gtaaatgata atgattatttt aacacaggca gaaacagaga cagcacatgc gttgtttact
1081 gcacaggaag caaaaacaaca tagagatgca gtacagggttc taaaacgaaa gtatttgggt
1141 agtccactta gtgatattag tggatgtgta gacaataata ttagtcctag attaaaagct
1201 atatgtatag aaaaaaaaag tagagctgca aaaaggagat ttttgaag cgaagacagc
1261 gggataggca atactgaagt gaaactcag cagatgttac aggtagaagg gcgccatgag
1321 actgaaacac catgtagtca gtatagtggt ggaagtgggg gtgggttcag tcagtacagt
1381 agtggaaagt ggggagaggg tgttagtgaa agacacacta tatgccaaac accacttaca
1441 aatattttta atgtactaaa aactagtaat gcaaaggcag caatgttagc aaaattttaa
1501 gagtatacag ggggtgagtt ttcagaatta gtaagacat ttaaaagtaa taaatcaacg
1561 tgttgcgatt ggtgtattgc tgcatttggc cttacacca gtatagctga cagtataaaa
1621 aactattac aacaatattg tttatattta cacattcaaa gtttagcatg ttcattggga
1681 atggttgtgt tactattagt aagatataaa tgtggaaaaa atagagaaac aattgaaaaa
1741 ttgctgtcta aactattatg tgtgtctcca atgtgtatga tgatagagcc tccaaaattg
1801 cgtagtacag cagcagcatt atattgggat aaaacaggta tatcaaatat tagtgaagtg
1861 tatggagaca cgccagaatg gatacaaaag caaacagtat tacaacatag tttaatgat
1921 tgtacatttg aattatcaca gatggtacaa tgggcctacg ataatgacat agtagacgat
1981 agtgaatttg catataaata tgcacaattg gcagacacta atagtaatgc aagtgccttt
2041 ctaaaaagta attcacaggc aaaaattgta aaggattgtg caacaatgtg tagacattat
2101 aaacgagcag aaaaaaaaac aatgagtatg agtcaatgga taaaatatag atgtgatagg
2161 gtagatgatg gaggtgattg gaagcaaatg gttatgtttt taaggatca aggtgtagag
2221 tttatgtcat ttttaactgc attaaaaaga tttttgcaag gcatacctaa aaaaaattgc
2281 atattactat atgggtcagc taacacaggt aaatcattat ttggtatgag ttaattgaaa
2341 tttctgcaag ggtctgtaat atgttttgya aattctaaaa gccatttttg gttacaacca
2401 ttagcagatg ccaaaatagg tatgttagat gatgctacag tgcctgttg gaactacata
2461 gatgacaatt taagaaatgc atgggatgga aatttagttt ctatggatgt aaagcataga
2521 ccattgggtac aactaaaatg ccctccatta ttaattacat ctaacattaa tgcctgttaca
2581 gattctaggt ggccttattt acataataga ttggtggtgt ttacatttcc taatgatttt
2641 ccatttgacg aaaaacgaaa tccagtgtat gagcttaatg ataagaactg gaaatccttt
2701 ttctcaagga cgtggccag attaagtttg cagaggacg aggacaagga aaacgatgga
2761 gactctttgc caacgtttaa atgtgtgtca ggacaaaata ctaacacatt atga

```

HPV 16 F HEX 5'-taatgatggttttatgtagaggct-3' (SEQ ID NO: 19)

HPV 16 R HEX objetivo 5'-ataatgattatttaacacaggcag-3' (SEQ ID NO: 71)

HPV 16 R HEX 5'-ctgcctgtgttaataatcattat-3' (SEQ ID NO: 20)

HR HPV 16/18 Sonda 5'-atatcagatgacgag-3' (SEQ ID NO: 38)

Figure 6B

HPV 18 E1 (SEQ ID NO: 46)

```

914 atggctg atccagaag tacagacggg gagggcacgg ggtgtaacgg
961 ctggttttat gtacaagcta ttgtagacaa aaaaacagga gatgtaatat ctgatgacga
1021 ggacgaaaaat gcaacagaca cagggtcgga tatggtagat tttattgata cacaaggaac
1081 attttgcaaa caggcagagc tagagacagc acaggcattg tttcatgctgc aggaggtcca
1141 caatgatgca caagtgttgc atgtttttaa acgaaagtgt gcaggaggca gcaaggaaaa
1201 cagtccatta ggggagcggc tggaggtgga tacagagtta agtccacggg tacaacaaat
1261 atcattaaat agtgggcaaa aaaaggcaaa aaggcggctg ttcacaatat cagatagtgg
1321 ctatggctgt tctgaagtgg aagcaacaca gattcaggta attacaaatg gcgaacaggg
1381 cggcaatgta tgtagtggcg gcagtacaga ggctatagac aatgggggca cagagggcaa
1441 caacagcagt gtagacggta caagtgcac tagcaatata gaaaatgtaa atccacaatg
1501 taccatagca caattaaaag acttggttaa agtaaacaaat aaacaaggag caatgttagc
1561 agtattttaa gacacatatt ggctatcatt tacagattta gttagaatt ttaaaagtga
1621 taaaaccacg tgtacagatt gggttacagc tatatttgya gtaaacccaa caatagcaga

```

ES 2 684 746 T3

```

1681 aggatttaaa acactaatac agccatttat attatatgcc catattcaat gtcttgactg
1741 taaatgggga gtattaatat tagccctggt gcgttacaaa tgtggtaaaa gtagactaac
1801 agttgctaaa ggtttaagta cgttgttaca cgtacctgaa acttgatgt taattcaacc
1861 accaaaattg cgaagtagtg ttgcagcact gtattggtat agaacaggaa tatcaaatat
1921 tagtgaagta atgggagaca cacctgagtg gatacaaaga cttactatta tacaacatgg
1981 aatagatgat agcaatthttg atthgtcaga aatggtacaa tgggcatttg ataatgagct
2041 gacagatgaa agcgatatgg catttgaata tgccttatta gcagacagca acagcaatgc
2101 ggctgccttt ttaaaaagca attgccaaagc taaatattta aaagattgtg ccacaatgtg
2161 caaacattat agcgagagccc aaaaacgaca aatgaaatag tcacagtggg tacgatttag
2221 atgttttaaaa atagatgaag ggggagattg gagaccaata gtgcaatthtt tgcgatacca
2281 acaaatagag thttataacat thtttaggagc cthtaaatca thtttaaaag gaactcccaa
2341 aaaaaattgt ttagtattct gtggaccagc aaatacagga aatcatatt ttggaatgag
2401 thttatacac thttatacaag gaggagtaat atcatttgta aattctacta gtcattthttg
2461 gttggaaccg ttaacagata ccaaggtggc catgtagat gatgcaacaa ccacgtggtg
2521 gacatacttt gatacctata tgagaaatgc thtagatggc aatcccataa gtattgatag
2581 aaagcacaaa ccattaatac aactaaaatg tcctccaata ctactaacca caaatataca
2641 tccagcaaag gataacagat ggccatattt agaaaagtaga ataacagtat ttgaattthc
2701 aatgcattht ccatttgata aaaaatggcaa tccagtatat gaaataaatg acaaaaattg
2761 gaaatgthtt thtgaaagga catggtccag attagatttg cacgaggaag aggaagatgc
2821 agacaccgaa ggaaaccctt tcggaacgtht taagtgcgtht gcaggacaaa atcatagacc
2881 actatga

```

```

HPV 18 F HEX          5'-ggctggthtttatgtacaagct-3' (SEQ ID NO: 21)
HPV 18 R HEX objetivo 5'-aaggaacattthttgtggaacagg-3' (SEQ ID NO: 72)
HPV18 R HEX          5'-cctgthtcaacaaaaatgthtcctt-3' (SEQ ID NO: 22)
HR HPV 16/18 Sonda   5'-atatctgatgacgag-3' (SEQ ID NO: 27/31/39)
HR HPV 16/18 Sonda   5'-atatcagatgacgag-3' (SEQ ID NO: 27/31/38)

```