



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 282 599**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03700338 .1**
(86) Fecha de presentación : **07.01.2003**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1463839**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.2004**

(54) Título: **Método para detectar ARNm del virus del papiloma humano.**

(30) Prioridad: **07.01.2002 GB 0200239**
19.06.2002 GB 0214124

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

(73) Titular/es: **Norchip A/S**
Industriveien 8
3490 Klokkearstua, NO

(72) Inventor/es: **Karlsen, Frank**

(74) Agente: **Ungria López, Javier**

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

Método para detectar ARNm del virus del papiloma humano.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos *in vitro* para el cribado de sujetos humanos con el fin de determinar su riesgo de desarrollar carcinoma cervical.

10 **Antecedentes de la invención**

El carcinoma cervical es una de las enfermedades malignas más comunes en todo el mundo y es una de las causas principales de morbilidad y mortalidad entre las mujeres (Parkin, D.M., Pisani, P., Ferlay, J. (1993) Int. J. Cancer, 54: 594-606; Pisani, P., Parkin, D.M., Ferlay, J. (1993) Int. J. Cancer, 55: 891-903). En 1996 se pronosticaron 15.700 nuevos casos de cáncer cervical invasivo en Estados Unidos, y la Organización Mundial de la Salud ha calculado que la incidencia mundial anual es de 450.000 (1990). La tasa de incidencia anual difiere en las diferentes partes del mundo, variando de 7,6 por 100.000 en el Asia occidental a 46,8 por 100.000 en África del Sur (Parkin y col., 1993, *ibid.*).

El concepto actual del carcinoma cervical es que el mismo es una enfermedad de múltiples etapas, desarrollándose a menudo a lo largo de un periodo de 10-25 años. El carcinoma del cérvix invasivo de células escamosas está representado por penetración a través de la lámina basal e invasión del estroma o la lámina propia epitelial. El curso clínico del carcinoma cervical presenta una variación considerable. El pronóstico ha sido relacionado con la etapa clínica, la implicación de nódulos linfáticos, la masa tumoral primaria, el tipo histológico, la profundidad de la invasión y la permeación linfática (Delgado, G. y col., (1990) Gynecol. Oncol., 38: 352-357). Algunas pacientes con características tumorales menos favorables tienen un desenlace relativamente bueno, mientras que otras sufren un desenlace fatal de una enfermedad inicialmente limitada. Esto muestra una clara necesidad de marcadores adicionales para caracterizar adicionalmente carcinomas cervicales recién diagnosticados, con el fin de administrar una terapia adaptada al riesgo (Ikenberg, H. y col., Int. J. Cancer, 59: 322-6, 1994).

La epidemiología del cáncer cervical ha mostrado una fuerte asociación con patrones religiosos, maritales y sexuales. Casi 100 estudios caso-control han examinado la relación entre el HPV y la neoplasia cervical y casi todos han encontrado asociaciones positivas (monografías de la IARC, 1995). La asociación es potente, consistente y específica para un número limitado de tipos víricos (Muñoz, N., Bosch, F.X. (1992) HPV and cervical neoplasia: review of case-control and cohort studies. IARC Sci. Publ., 251-261). Entre los estudios más informativos, se han observado fuertes asociaciones con el ADN de HPV 16 con una consistencia notable para cáncer invasivo y lesiones CIN de grado alto, descartando la posibilidad de que esta asociación pueda ser explicada por el azar, sesgo o confusión (monografías de la IARC, 1995). Pruebas indirectas sugerían que el ADN de HPV detectado en las células cancerosas es un buen marcador del papel de la infección por HPV en las etapas tempranas de la carcinogénesis. Se ha descrito una relación dosis-respuesta entre un incremento de la carga vírica y el riesgo de carcinoma cervical (Muñoz y Bosch, 1992, *ibid.*). En algunas series más grandes hasta un 100% de los tumores eran positivos para HPV, pero la existencia de carcinomas cervicales negativos para el virus está todavía en debate (Meijer, C.J. y col. (1992) Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology: possible implications for cervical cancer screening. IARC Sci. Publ., 271-281; Das, B.C. y col., (1993) Cancer, 72: 147-153).

Los tipos de HPV más frecuentes encontrados en carcinomas cervicales de células escamosas son HPV 16 (41%-86%) y 18 (2%-22%). Además, se han encontrado también HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 59, 61, 66 y 68 (monografías de la IARC, 1995). En la Conferencia Internacional HPV2000 de Barcelona, se definieron HPV 16, 18, 31 y 45 como de alto riesgo, mientras que HPV 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 68 fueron definidos como de riesgo intermedio (Keerti, V., Shah, P71). Los 13 HPVs de alto riesgo más los de riesgo intermedio son a menudo referidos todos juntos como tipos de HPV asociados a cáncer.

Varios estudios han explorado el papel potencial del análisis de HPV en el cribado de cáncer cervical (ver Cuzick y col., A systematic review of the role of human papillomavirus testing withing a cervical screening programme. Health Technol. Assess., 3: 14, 1999).

Reid y col. (Reid, R. y col. (1991) Am. J. Obstet. Gynecol., 164: 1461-1469) fueron los primeros en demostrar un papel para el análisis de HPV en un contexto de cribado. Este estudio se llevó a cabo en mujeres de alto riesgo procedentes de clínicas de enfermedades transmitidas sexualmente y de ginecólogos especialistas, y utilizó una hibridación de transferencia Southern (de baja rigurosidad) sensible para la detección del HPV. Participaron un total de 1012 mujeres y la cervicografía se consideró también como un posible auxiliar para la citología. Se encontraron en total 23 lesiones CIN II/III, pero solamente 12 fueron detectadas por citología (sensibilidad 52%, especificidad 92%). El análisis de HPV encontró 16 lesiones de grado alto.

Bauer y col. (Bauer, H.M. y col. (1991) JAMA, 265: 472-477) describen un estudio temprano basado en PCR utilizando cebadores MY09/11 (Manos, M. y col. (1990) Lancet, 335: 734) en mujeres jóvenes que acudieron para que les fueran realizados frotis rutinarios (estudiantes universitarias). Encontraron una tasa positiva del 46% en 467 mujeres, que era mucho más elevada que para el ensayo de transferencia de manchas (11%).

ES 2 282 599 T3

- En un estudio utilizando PCR con cebadores GP5/6 (van der Brule, A.J. y col. (1990) J. Clin. Microbiol., 28: 2739-2743) van der Brule y col. (van der Brule, A.J. y col. (1991) Int. J. Cancer, 48: 404-408) mostraron una correlación muy potente entre la positividad para HPV y la neoplasia cervical según se determinó por citología. En mujeres mayores (35-55 años de edad) con citología negativa la tasa de positividad para HPV era únicamente del 3,5%, y ésta se redujo al 1,5% si se consideraban únicamente los tipos 16, 18, 31 y 33, mientras que las mujeres con carcinoma histológico *in situ* eran todas positivas para HPV y el 90% tenía uno de los cuatro tipos anteriores. Las mujeres con anomalías citológicas menos graves tenían menores tasas de positividad para HPV de manera gradual, mostrándose una clara tendencia.
- Roda Housman y col. (Roda Housman, A.M. y col. (1994) Int. J. Cancer, 56: 802-806) extendieron todas estas observaciones examinando a 1373 mujeres más con frotis anormales. Este estudio confirmó también una tasa de positividad creciente con la gravedad creciente de los resultados de los frotis. Observaron también que el nivel de heterogeneidad del HPV disminuía desde 22 tipos para los frotis de grado bajo hasta diez tipos de “alto riesgo” para los frotis de grado alto. Este artículo no incluía mujeres citológicamente negativas, ni tampoco ninguna enfermedad citológica confirmada histológicamente.
- Cuzick y col. (Cuzick, J. y col. (1992) Lancet, 340: 112-113; Cuzick, J. y col. (1994) Br. J. Cancer, 69: 167-171) fueron los primeros en describir que el análisis del HPV proporcionaba una información útil para la clasificación de anomalías citológicas detectadas durante un cribado aleatorio. En un estudio de 133 mujeres, remitidas para colposcopia, encontraron un valor predictivo positivo del 42%, que era similar al de la discariosis moderada. Los resultados fueron más sorprendentes para HPV 16, donde se encontró que 39 de 42 mujeres positivas para HPV 16 tenían un CIN de grado alto en la biopsia. Este estudio resaltaba la importancia de la determinación de la carga vírica y consideraba únicamente como positivos los niveles elevados de los tipos de alto riesgo.
- Cox y col. (Cox, J.T. y col. (1995) Am. J. Obstet. Gynecol., 172: 946-954) demostraron un papel del análisis de HPV utilizando el sistema de Captura Híbrida (Hybrid Capture™) (DIGENE Corporation, Gaithersburg, MD, EE.UU.) para la clasificación de mujeres con frotis dudosos. Este ensayo fue realizado en 217 mujeres procedentes de un servicio de remisión universitario y se encontró una sensibilidad del 93% para CIN II/III en comparación con un 73% para citología repetida. Se encontró que una carga vírica elevada mejoraba además el funcionamiento del ensayo reduciendo los falsos positivos. Cuando se tomó como valor de corte 5 RLU, se encontró un PPV del 24% aproximadamente sin pérdida de la sensibilidad.
- Cuzick y col. (Cuzick, J. y col. (1995) Lancet, 345: 1533-1536) evaluaron el análisis de HPV en el contexto de un cribado primario en 1985 mujeres que acudieron a un cribado rutinario en una clínica de planificación familiar. La sensibilidad utilizando PCR específica de tipo para los cuatro tipos comunes de HPV (75%) era superior a la de la citología (46%), y el PPV para un ensayo de HPV positivo (42%) era similar al obtenido para una discariosis moderada (43%).
- WO 91/08312 describe métodos para determinar el pronóstico de individuos infectados con HPV que comprenden la medida del nivel de actividad HPV mediante la detección de transcritos de todos o de una porción de los genes E6 y/o E7 de HPV en una muestra y la comparación de las medidas de la actividad HPV con una relación previamente establecida entre la actividad y el riesgo de progresión hacia una displasia cervical grave o hacia carcinoma cervical.
- WO 99/29890 describe métodos para determinar la infección por HPV basados en la medida y en el análisis de los niveles de expresión génica. En particular, WO 99/29890 describe métodos que están basados en la medida de los niveles de expresión de dos o más genes del HPV (por ejemplo E6, E7, L1 y E2 del HPV) y la comparación posterior de la tasa de expresión de combinaciones de estos genes para proporcionar una indicación de la etapa de la enfermedad basada en HPV en una paciente.
- EP-A-0 662 518 (AMOCO Corp.; 12.07.1995) describe un método para detectar transcritos de ARNm de E6/E7 que son “indicadores o predictores del riesgo de progresión hacia displasia grave o carcinoma cervical” (página 2, líneas 23-32). El método de pronóstico está basado “en la asociación entre la actividad transcripcional del HPV y el riesgo de desarrollo de displasia cervical grave o carcinoma cervical” (página 2, línea 58). Este documento explica que “la expresión de los genes E6 y/o E7 de HPV 16 y 18 es importante para la transformación celular y puede ser importante para el desarrollo de CIS” (página 4, línea 40) y que “los transcritos de E6* pueden estar relacionados con el potencial oncogénico de los tipos de HPV” (página 5, línea 4). Además, describe que patrones de expresión específicos “proporcionan la base mediante la cual se utiliza el presente método para determinar el riesgo de progresión de anomalías cervicales” (página 5, líneas 11-14).
- EP-A-0 373 352 (BEHRINGWERKE AG; 20.06.1990) describe un método para la detección de ARNm de E6/E7 del HPV (Ejemplos 1-4) como indicación del potencial maligno del HPV (página 2, líneas 16-21) y proporciona una explicación sobre la asociación entre HPV y carcinoma cervical, el impacto de la integración en el genoma de E6/E7 sobre la transformación maligna y la intensa transcripción de E6/E7 en células transformadas (página 2). El método está dirigido a la detección de transcritos de E6/E7 con fin pronóstico (página 5, línea 7 y línea 34). Además, describe cebadores para amplificar el ARNm de E6/E7 (Ejemplos 4a y 4b).
- WO 94 26934 A (Brown Janice, T.; Baxter Diagnostics Inc. (EE.UU.); 24.11.1994) describe un ensayo específico para determinar infecciones por HPV asociadas con displasia cervical y transformación celular a malignidad mediante

la detección de transcritos de ARNm de E6/E7 de tipos de HPV de alto riesgo (página 2, líneas 23-31). El documento explica que “la expresión de E6/E7 es un diagnóstico de cáncer cervical o de estados premalignos”.

Smits, H.L. y col. (“Application of the NASBA nucleic acid amplification method for the detection of human papillomavirus type 16 E6-E7 transcripts”, Journal of Virological Methods, Amsterdam, Países Bajos, vol. 54, n° 1, 1995, páginas 75-81) describe un método para detectar la expresión de transcritos de ARNm de E6 de HPV en frotis cervicales mediante amplificación isotérmica por NASBA (ver el Resumen y las páginas 76-80). En ella se explica que “la detección rápida de ARN de HPV 16 podría ser potencialmente valiosa en estudios epidemiológicos o como herramienta de diagnóstico”, que “la detección específica de ARN (E6/E7) permitiría la detección de infecciones víricas transcripcionalmente activas” y que “la expresión de E6 y E7 parece ser requerida para *inducir* y mantener el estado maligno” (página 76). El documento describe también pares de cebadores para amplificar el ARNm de E6/E7 del HPV 16.

Los presentes inventores han determinado que es posible llevar a cabo una determinación clínicamente útil de la enfermedad asociada al HPV basada únicamente en una simple determinación positiva/negativa de la expresión de transcritos de ARNm de L1 y E6 del HPV, sin requerir medidas cuantitativas precisas de los niveles de expresión ni la determinación de diferencias en los niveles de expresión de los dos transcritos. Este método es técnicamente sencillo y, en una realización preferida, es susceptible de automatización en un formato de rendimiento medio a elevado. Además, sobre la base de los resultados obtenidos, los inventores han definido un nuevo esquema de clasificación de pacientes sobre la base del riesgo de desarrollar carcinoma cervical que está relacionado con cambios moleculares relevantes para la enfermedad en el patrón de la expresión de genes del HPV y que es independiente de la clasificación CIN.

Este método comprende un método *in vitro* de cribado de sujetos humanos para determinar su riesgo de desarrollar carcinoma cervical, que comprende la selección por la expresión de transcritos de ARNm del gen L1 y del gen E6 del virus del papiloma humano, en el que los sujetos positivos para la expresión de ARNm de L1 y/o de E6 de longitud completa son clasificados como con riesgo de desarrollar carcinoma cervical.

Un resultado positivo en el cribado con el método está indicado por la expresión positiva de ARNm de L1 y/o ARNm de E6 en células del cérvix. La expresión positiva de cada uno de estos ARNms o de ambos ARNms es considerada como una indicación de que el sujeto tiene “riesgo” de desarrollar carcinoma cervical. Las mujeres que expresan ARNm de E6 tienen un riesgo elevado de desarrollar cambios celulares, ya que los E6 y E7 oncogénicos se unen a proteínas reguladoras del ciclo celular y actúan como activadores de la proliferación celular. La expresión clara de ARNm de E6 proporciona una indicación directa de cambios celulares en el cérvix. La expresión de ARNm de L1, con o sin la expresión de ARNm de E6, es también indicativa de la presencia de un HPV activo.

En el contexto más amplio del cribado cervical, las mujeres identificadas como positivas para la expresión de ARNm de L1 y/o E6, pueden ser seleccionadas para una investigación posterior, utilizando por ejemplo citología. Por tanto, en un nivel, el método puede proporcionar un medio técnicamente sencillo de precibado de una población de mujeres con el fin de identificar a aquellos sujetos positivos para HPV que pueden ser seleccionados para una investigación posterior.

En una realización específica, el método puede ser utilizado para clasificar sujetos en cuatro clases diferentes de riesgo de desarrollar carcinoma cervical sobre la base de la valoración positiva/negativa de la expresión del ARNm de L1 y E6.

En un aspecto adicional, el método comprende un método *in vitro* para el cribado de sujetos humanos con el fin de determinar su riesgo de desarrollar carcinoma cervical, que comprende la selección del sujeto por la expresión de transcritos de ARNm del gen L1 del HPV y de transcritos de ARNm del gen E6 del HPV, y la clasificación del sujeto en una de cuatro categorías de riesgo de desarrollar carcinoma cervical sobre la base de la expresión de ARNm de L1 y/o E6 de acuerdo con la clasificación siguiente:

Categoría de riesgo 1: sujetos negativos para la expresión de ARNm de L1 pero positivos para la expresión de ARNm de E6 de al menos uno de los tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 ó 68. Aquellos individuos positivos para la expresión de ARNm de E6 de al menos uno de los tipos de HPV 16, 18, 31 ó 33 son clasificados como de riesgo más elevado, en comparación por ejemplo con los individuos negativos para estos tipos pero positivos para la expresión de ARNm de E6 de al menos uno de los tipos de HPV 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 ó 68.

Categoría de riesgo 2: sujetos positivos para la expresión de ARNm de L1 y positivos para la expresión de ARNm de E6 de al menos uno de los tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 ó 68. Aquellos individuos positivos para la expresión de ARNm de E6 de al menos uno de los tipos de HPV 16, 18, 31 ó 33 son clasificados como de riesgo más elevado, en comparación por ejemplo con los individuos negativos para estos tipos pero positivos para la expresión de ARNm de E6 de al menos uno de los tipos de HPV 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 ó 68.

Categoría de riesgo 3: sujetos positivos para la expresión de ARNm de L1 pero negativos para la expresión de ARNm de E6 de los tipos de HPV asociados con cáncer (por ejemplo negativos para la expresión de ARNm de E6 de los tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 y 68).

ES 2 282 599 T3

Categoría de riesgo 4: sujetos negativos para la expresión de ARNm de L1 y negativos para la expresión de ARNm de E6.

5 En una realización preferida, la expresión positiva está indicada por la presencia de más de 50 copias del transcrito por ml (o volumen total de la muestra) y la expresión negativa está indicada por la presencia de menos de 1 copia del transcrito por ml (o volumen total de la muestra).

10 La clasificación anterior está basada en acontecimientos moleculares que son relevantes para el riesgo de desarrollar carcinoma cervical y es independiente del estatus CIN de los sujetos. Por tanto, este método de clasificación puede proporcionar una alternativa a la utilización de citología en el cribado rutinario de mujeres para identificar aquéllas con riesgo potencial de desarrollar carcinoma cervical. El método puede ser también utilizado como auxiliar de la citología, por ejemplo como un ensayo de confirmación para confirmar la determinación del riesgo realizada sobre la base de la citología.

15 Las mujeres positivas para la expresión del ARNm de E6 de alto riesgo de uno de los tipos de HPV 16, 18, 31 ó 33, pero negativas para la expresión de L1, están dentro del nivel de riesgo más elevado de desarrollar cambios celulares y anormalidades celulares graves. Esto es debido al hecho de que un resultado negativo para la expresión de ARNm de L1 es indicativo directamente de un HPV integrado, y por tanto de una mayor probabilidad de una expresión elevada y constante de E6 y E7. La integración de un virus en el genoma humano tiene también un impacto directo sobre la estabilidad de las células. La integración del HPV reduce también la posibilidad de regresión de los cambios celulares.

20 Las mujeres positivas para la expresión de ARNm de E6 de uno de los tipos de HPV 16, 18, 31 ó 33 y positivas para la expresión de ARNm de L1, tienen una expresión de HPV de “alto riesgo” y todavía es posible que el HPV se haya integrado. Sin embargo, el riesgo de estas mujeres no es clasificado como tan elevado como el de las mujeres que son negativas para L1 y positivas para E6, ya que existe una probabilidad razonable de que no tengan HPV integrado.

30 Las mujeres negativas para la expresión de ARNm de E6 de los tipos de HPV 16, 18, 31 ó 33 pero positivas para la expresión de ARNm de E6 de otro tipo de HPV, por ejemplo 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 y 68, son todavía consideradas como de “riesgo” y pueden ser por tanto situadas en las categorías de riesgo 1 ó 2 (según se definieron anteriormente) dependiendo de si son positivas o negativas para la expresión de ARNm de L1.

35 Las mujeres positivas para ARNm de L1 pero negativas para ARNm de E6 son clasificadas como de riesgo moderado. Puede haber tipos de HPV de alto riesgo en la muestra y la expresión de L1 es indicativa de actividad lítica. Puede haber también tipos de HPV integrados pero únicamente con virus que son poco frecuentes. Sin embargo, la detección de actividad lítica puede mostrar que la célula podrá desarrollar pronto ciertos cambios.

40 En el contexto más amplio del cribado cervical, el método puede ser utilizado para clasificar mujeres de acuerdo con el riesgo de desarrollar carcinoma cervical y proporcionar por tanto una base para tomar decisiones concernientes al tratamiento y/o al cribado posterior. A manera de ejemplo: mujeres dentro de la categoría de riesgo 1, particularmente las que presentan expresión positiva de ARNm de E6 de al menos uno de los tipos de HPV 16, 18, 31 ó 33, podrían ser identificadas como requeridoras de una “acción inmediata”, significando conización o colposcopia, incluyendo una biopsia e histología.

45 Las mujeres dentro de la categoría de riesgo 2, según se definió anteriormente, podrían ser clasificadas como requeridoras de atención inmediata, significando colposcopia sola o colposcopia incluyendo una biopsia e histología.

50 Las mujeres dentro de la categoría de riesgo 3, según se definió anteriormente, podrían ser clasificadas como requeridoras de un nuevo análisis inmediato, significando que deben ser convocadas de nuevo para un análisis adicional con el fin de determinar la expresión de HPV ya sea inmediatamente o después de un intervalo relativamente corto, por ejemplo seis meses.

Las mujeres dentro de la categoría de riesgo 4, según se definió anteriormente, podrían ser devueltas al programa de cribado, con el fin de ser analizadas de nuevo para determinar la expresión de HPV en una fecha posterior.

55 En una realización adicional, el método proporciona un método *in vitro* para el cribado de sujetos humanos por la presencia de HPV integrado o de un genoma de HPV episómico modificado, método que comprende la selección del sujeto por la expresión de transcritos de ARNm del gen L1 y del gen E6 del virus del papiloma humano, en el cual los sujetos negativos para la expresión de ARNm de L1 pero positivos para la expresión de ARNm de E6 son clasificados como portadores de HPV integrado.

60 El término “HPV integrado” se refiere a un genoma de HPV que está integrado en el genoma humano.

65 El término “genoma de HPV episómico modificado” significa un genoma de HPV que está retenido en una célula del sujeto humano como un episoma, esto es que no está integrado en el genoma humano, y que lleva una modificación en comparación con el genoma de HPV de tipo salvaje equivalente, modificación que da lugar a la expresión constitutiva o persistente de transcritos de los genes E6 y/o E7. La “modificación” será típicamente una delección, una multimerización o concatemerización del episoma, una reordenación del episoma, etc., que afecte a la regulación de la expresión de E6/E7.

Según se mencionó anteriormente, la presencia de HPV integrado o de un genoma de HPV episómico modificado está indicada por un resultado negativo para la expresión de ARNm de L1, junto con un resultado positivo para la expresión de ARNm de E6 en células del cérvix. Por tanto, la capacidad para predecir la presencia de HPV integrado o de un genoma de HPV episómico modificado en este ensayo, depende críticamente de la capacidad para valorar un resultado negativo para la expresión de ARNm de L1. Esto requiere una técnica de detección que tenga una sensibilidad máxima y que produzca además mínimos resultados negativos falsos. En una realización preferida, esto se consigue utilizando una técnica de amplificación y de detección en tiempo real sensible para seleccionar por la presencia o ausencia de ARNm de L1. La técnica más preferida es la amplificación por NASBA en tiempo real utilizando sondas moleculares fluorescentes (“beacons”), según está descrito por Leone y col., Nucleic Acids Research, 1998, Vol. 26, 2150-2155. Debido a la sensibilidad de esta técnica, se minimiza la aparición de resultados falsos negativos y puede valorarse un resultado de “expresión negativa de L1” con una mayor confianza.

De acuerdo con la invención, un método de cribado de sujetos humanos por la presencia de HPV integrado o de un genoma de HPV episómico modificado puede estar basado en el cribado por la expresión de ARNm de E6 solo. Por tanto, la invención se refiere a un método *in vitro* para el cribado de sujetos humanos por la presencia de HPV integrado, método que comprende la selección del sujeto por la expresión de transcritos de ARNm del gen E6 del virus del papiloma humano, en particular de cada uno, y únicamente, de los tipos de HPV 16, 18, 31, 33 y 45 utilizando una técnica de amplificación, en el que los sujetos positivos para la expresión de ARNm de E6 de al menos de uno de dichos tipos de HPV son clasificados como portadores de HPV integrado.

Además, los individuos son clasificados como pertenecientes a una de dos categorías de riesgo de desarrollar carcinoma cervical sobre la base de una determinación “sí/no” de la expresión del ARNm de E6 solo. Por tanto, en particular, la invención proporciona un método *in vitro* para el cribado de sujetos humanos con el fin de determinar su riesgo de desarrollar carcinoma cervical, método que comprende la selección del sujeto por la expresión de transcritos de ARNm del gen E6 de cada uno, y únicamente, de los tipos de HPV 16, 18, 31, 33 y 45 utilizando una técnica de amplificación, y la clasificación del sujeto en una de dos categorías de riesgo de desarrollar carcinoma cervical sobre la base de la expresión del ARNm de E6 de al menos de dichos tipos de HPV, en el cual los individuos positivos para la expresión de dicho ARNm de E6 son clasificados como portadores de HPV integrado y son por tanto clasificados como de “alto riesgo” de desarrollar carcinoma cervical, mientras que los individuos negativos para la expresión de dicho ARNm de E6 son clasificados como no portadores de HPV integrado y son por tanto clasificados como “sin riesgo detectable” de desarrollar carcinoma cervical.

Los sujetos son clasificados en una de dos categorías de riesgo de desarrollar carcinoma cervical sobre la base de una determinación “sí/no” de la expresión de dicho ARNm de E6 en células del cérvix. Los individuos positivos para la expresión de ARNm de E6 de al menos uno de los tipos de HPV 16, 18, 31, 33 y 45 son clasificados como portadores de HPV integrado o de un genoma de HPV episómico modificado y son por tanto clasificados como de “alto riesgo” de desarrollar carcinoma cervical, mientras que los individuos negativos para la expresión de dicho ARNm de E6 son clasificados como no portadores de HPV integrado ni de un genoma de HPV episómico modificado y son por tanto clasificados como “sin riesgo detectable” de desarrollar carcinoma cervical.

En el contexto del cribado cervical, la clasificación de los sujetos en los dos grupos con “alto riesgo” o “sin riesgo detectable” de desarrollar carcinoma cervical proporciona una base para tomar decisiones concernientes al tratamiento y/o a un cribado posterior. Por ejemplo, los sujetos en la categoría de alto riesgo pueden ser clasificados como requeridores de un análisis adicional inmediato, por ejemplo mediante colposcopia histológica, mientras que los que están en la categoría de riesgo no detectable pueden ser remitidos de nuevo al programa de cribado a intervalos de tres o cinco años. Estos métodos son particularmente útiles para determinar el riesgo de desarrollar carcinoma en sujetos que se sabe que están infectados con HPV, por ejemplo los que dan positivo para ADN de HPV, o en sujetos que han manifestado previamente una anomalía cervical por citología o frotis Pap. Los sujetos colocados en la categoría de “sin riesgo detectable” sobre la base de la expresión de ARNm de E6, pueden tener presente ADN de HPV, pero el resultado negativo de la expresión de E6 indica que el HPV no está relacionado con actividad oncogénica en el momento del análisis.

La presencia de HPV integrado, según indica un resultado positivo para la expresión de ARNm de E6, es en sí misma indicativa de que el sujeto tiene cambios celulares anormales en el cérvix. Por tanto, se proporciona un método que es un método *in vitro* para identificar sujetos humanos que tengan cambios celulares anormales en el cérvix, método que comprende la selección del sujeto por la expresión de transcritos de ARNm del gen E6 de un HPV de los enumerados anteriormente, en el que los individuos positivos para la expresión de ARNm de E6 son identificados como portadores de cambios celulares anormales en el cérvix.

El término “cambios celulares anormales en el cérvix”, incluye cambios celulares que son característicos de una enfermedad más grave que las lesiones cervicales de grado bajo o que las lesiones intraepiteliales escamosas de grado bajo; incluye cambios celulares que son característicos de enfermedades de igual o mayor gravedad que la CIN de alto grado (definida como una expansión neoplásica de células transformadas), CIN (neoplasia intraepitelial cervical) III o neoplasia intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL), incluyendo lesiones con un perfil de ADN multiploide y lesiones CIN “malignas” con valores incrementados del índice medio de ADN, un elevado porcentaje de aneuploidia de ADN y tasas que exceden 2,5c (Hanselaar y col., 1992, Anal. Cell. Pathol., 4: 315-324; Rihet y col., 1996, J. Clin. Pathol., 49: 892-896; y McDermott y col., 1997, Br. J. Obstet. Gynaecol., 104: 623-625).

La Neoplasia Intraepitelial Cervical (abreviada "CIN"), denominada también Displasia Cervical, es una condición cervical causada por el Virus del Papiloma Humano. La CIN es clasificada como I, II o III dependiendo de su gravedad. Se considera una anormalidad precancerosa, pero no un cáncer real. La forma más leve, CIN I, remite normalmente por sí misma, aunque raramente puede progresar a cáncer. Las formas más graves, CIN II y CIN III, muy a menudo permanecen igual o empeoran con el tiempo. Pueden convertirse en cáncer, pero casi nunca lo hacen si son tratadas adecuadamente.

EL HPV ha sido identificado como un agente causante del desarrollo de cambios celulares en el cérvix, que pueden dar lugar al desarrollo de cáncer cervical. Estos cambios celulares están asociados con la expresión constitutiva o persistente de las proteínas E6/E7 del genoma vírico de HPV. Por tanto, es posible concluir que aquellos sujetos en los que puede ser detectada la expresión de ARNm de E6, particularmente aquellos sujetos que presentan una expresión de E6 persistente cuando se determina a lo largo de un periodo de tiempo, manifiestan ya cambios celulares en el cérvix. Estos cambios celulares pueden tener lugar solamente en unas pocas células del cérvix y pueden no ser detectables mediante citología convencional. No obstante, con la utilización de métodos sensibles, específicos y precisos para la detección de ARNm de E6, es posible identificar a aquellos sujetos que presentan ya cambios celulares en el cérvix en un estado mucho más temprano del que sería posible utilizando el cribado citológico convencional. Esto permitirá una intervención más temprana con tratamientos encaminados a prevenir el desarrollo de carcinoma cervical.

Como resultado de la integración de HPV en el genoma o como resultado de la "modificación" en un genoma de HPV episómico modificado, se pierde el control normal de la transcripción de los oncogenes E6/E7 víricos (Durst y col., 1985, J. Gen. Virol., 66 (Pt 7): 1515-1522; Pater y Pater, 1985, Virology, 145: 313-318; Schwarz y col., 1985, Nature, 314: 111-114; Park y col., 1997, *ibid.*). En contraste, en lesiones premalignas y en epitelio normal infectado con HPV, los virus del papiloma predominan en formas episómicas "sin modificar" y por tanto la transcripción del oncogén puede estar ausente o estar regulada por disminución eficazmente (Johnson y col., 1990, J. Gen. Virol., 71 (Pt 7): 1473-1479; Falcinelli y col., 1993, J. Med. Virol., 40: 261-265). Se ha observado que la integración de ADN del virus del papiloma humano de tipo 16 en el genoma humano da lugar a una actividad celular/genoma más inestable, y a una estabilidad incrementada de los ARNms de E6 y E7 (Jeon y Lambert, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 1654-1658). Por tanto, la integración del HPV, encontrada típicamente en cánceres cervicales pero encontrada solamente de manera poco frecuente en lesiones CIN (Carmody y col., 1996, Mol. Cell. Probes, 10: 107-116), parece ser un acontecimiento importante en la carcinogénesis cervical.

El presente método detecta la expresión de ARNm vírico de E6/E7 en el cérvix en lugar de ADN. La expresión vírica de E6/E7 en células cervicales es una determinación del riesgo de desarrollar cáncer mucho más precisa que demostrar simplemente que el virus HPV está presente. Además, la detección de transcritos de oncogenes del HPV puede ser un indicador más sensible de la implicación directa de oncogenes víricos en la carcinogénesis (Rose y col., 1994, Gynecol. Oncol., 52: 212-217; Rose y col., 1995, Gynecol. Oncol., 56: 239-244). La detección de transcritos de E6/E7 por amplificación y detección es una herramienta de diagnóstico útil para las evaluaciones del riesgo relacionado con el desarrollo de CIN y su progresión a cáncer cervical, especialmente en las pacientes infectadas por tipos de HPV de alto riesgo con ASCUS y CIN I (Sotlar y col., 1998, Gynecol. Oncol., 69: 114-121; Selinka y col., 1998, Lab. Invest., 78: 9-18).

La expresión de transcritos de E6/E7 de HPV 16/18 está correlacionada uniformemente con el estatus físico de los ADNs del HPV (Park y col., 1997, Gynecol. Oncol., Vol. 65(1), 121-9). En la mayoría de las células de carcinoma cervical, los genes E6 y E7 de virus del papiloma humano específicos son transcritos a partir de secuencias víricas integradas en los cromosomas de las células huésped (von Kleben Doeberitz y col., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88(4), 1411-5). La carga y la integración víricas han sido evaluadas en una serie grande de lesiones CIN (Pietsaro y col., 2002, J. Clin. Microbiol., Vol. 40(3), 886-91). Solamente una muestra contenía exclusivamente ADN de HPV 16 episómico, y esta lesión regresó espontáneamente. Se identificaron previamente 17 de 37 muestras de carcinoma cervical invasivo como contenedoras del genoma de HPV 16 completamente integrado mediante la utilización de una PCR que cubría el gen E1/E2 completo, y esto fue confirmado mediante rliPCR en 16 casos. Un caso, sin embargo, mostró un bajo nivel de ácido desoxirribonucleico episómico además de la forma integrada predominante. De las 20 muestras de carcinoma restantes que presentaban formas episómicas en los análisis previos, se encontraron 14 que contenían formas integradas utilizando rliPCR, y 4 contenían formas episómicas multiméricas (modificadas). Por tanto, en total, 31 de 37 de los carcinomas (84%) presentaban el genoma de HPV 16 integrado, mientras que no pudo detectarse la ausencia de integración (Kalantari y col., 2001, Diagn. Mol. Pathol., Vol. 10(1), 46-54).

No ha habido virtualmente ninguna observación de que existan células de carcinoma cervical sin ADN de HPV integrado o sin ADN de HPV episómico modificado (Kalantari y col., 2001; Pietsaro y col., 2002, *ibid.*). Se ha demostrado además que E6 y E7 pueden ser transcritos únicamente a partir de ADN de HPV integrado o episómico modificado (von Kleben Doeberitz y col., 1991, *ibid.*). Por tanto, los inventores suponen que la detección de la expresión de E6/E7 proporciona una indicación directa de HPV integrado o HPV episómico modificado y de una elevada actividad oncogénica, y concluyen que en un contexto clínico la detección de la expresión de E6 (E6/E7) sola es suficiente para identificar sujetos con "riesgo elevado" de desarrollar carcinoma cervical. En otras palabras, si puede detectarse la expresión de ARNm de E6/E7 en una muestra cervical, esto es indicativo directamente de anormalidades celulares en el cérvix y existe un riesgo muy elevado de desarrollar carcinoma cervical debido a la actividad persistente de los oncogenes del HPV. Por tanto, la detección de ARNm de E6/E7 en un sujeto humano indica que el sujeto tiene un riesgo muy elevado de desarrollar carcinoma cervical y debería ser sometido a un cribado adicional inmediato, por ejemplo mediante colposcopia.

Si no se detecta la expresión de ARNm de E6/E7 de HPV, el sujeto puede aún tener una infección por HPV. Sin embargo, debido a la ausencia de integración y de actividad oncogénica, puede remitir espontáneamente (según ha sido observado por Pietsaro y col., 2002, *ibid.*).

En un contexto clínico, la realización de métodos que se basan en el cribado por la expresión de ARNm de E6 solo, depende de manera crítica de la capacidad para calificar con confianza un resultado negativo para la expresión de ARNm de E6. Esto requiere de nuevo una técnica de detección que tenga una sensibilidad máxima, a la vez que produzca resultados falsos negativos mínimos. En una realización preferida, esto se consigue mediante la utilización de una técnica de amplificación y detección en tiempo real sensible para seleccionar por la presencia o ausencia de ARNm de E6. La técnica más preferida es la amplificación mediante NASBA en tiempo real utilizando sondas moleculares fluorescentes, según está descrito por Leone y col., Nucleic Acids Research, 1998, Vol. 26, 2150-2155. Debido a la sensibilidad de esta técnica, la aparición de resultados falsos negativos está minimizada y un resultado de “expresión negativa de E6” puede ser calificado con mayor confianza. Esto es extremadamente importante si los ensayos van a ser utilizados en el contexto de un programa de cribado clínico.

En los métodos de la invención basados en la detección de ARNm de E6 solo, es necesario detectar únicamente HPV 16, 18, 31, 33 y 45. Se ha detectado ADN de los tipos de HPV 16, 18, 31 y 33 en más de un 87% de muestras de carcinoma cervical (Karlsen y col., 1996, J. Clin. Microbiol., 34: 2095-2100). Otros estudios han demostrado que E6 y E7 son conservados casi invariablemente en los cánceres cervicales, ya que es probable que su expresión sea necesaria para la conversión en, y el mantenimiento de, el estado maligno (Choo y col., 1987, J. Med. Virol., 21: 101-107; Durst y col., 1995, Cancer Genet. Cytogenet., 85: 105-112). En contraste con los sistemas de detección de HPV que están basados en la detección del genoma no dañado o de la secuencia del gen L1, la detección del ARNm de HPV expresado a partir del área E6/E7 puede detectar más de un 90% de las pacientes relacionadas directamente con un riesgo de desarrollar carcinoma cervical.

En la clínica, se prefieren los métodos basados en la detección del ARNm de E6 para utilización en el post-cribado, esto es en un análisis posterior de individuos que tengan un diagnóstico previo de ASCUS, CIN I o condiloma. El método puede ser utilizado para seleccionar a aquellos sujetos con un riesgo elevado de desarrollar carcinoma cervical de entre el grupo de individuos con un diagnóstico previo de ASCUS, CIN I o condiloma. ASCUS, condiloma y CIN I pueden ser definidos como más o menos el mismo diagnóstico, debido a una reproducibilidad muy baja entre diferentes citólogos y diferentes departamentos de citología. Östör (Int. J. Gyn. Path., 12: 186-192, 1993) encontró que solamente alrededor del 1% de los casos de CIN I puede progresar a carcinoma cervical. Por tanto, existe la necesidad genuina de un método eficaz para identificar el subgrupo de individuos con ASCUS, condiloma o CIN I con un riesgo sustancial de desarrollar carcinoma cervical. Uno de los tipos de HPV 16, 18, 31 ó 33 fue detectado en el 87% de los casos de carcinoma cervical estudiados por Karlsen y col., 1996. Mediante la inclusión del HPV 45, se ha encontrado que casi el 90% de las muestras de carcinoma cervical están relacionadas con estos cinco tipos de HPV. Por tanto, calculado a partir de los datos proporcionados por Östör (Int. J. Gyn. Path., 12: 186-192, 1993) más de un 99,9% son casos detectados con ASCUS, CIN I o condiloma pasados por alto por nuestro kit HPV-Proofer.

En los métodos de la invención, se considera que la “expresión positiva” de un ARNm indica una expresión por encima del fondo. No existe un requisito absoluto de determinación cuantitativa precisa del nivel de expresión de ARNm o de una determinación precisa de los niveles relativos de expresión del ARNm de L1 y E6.

En ciertas realizaciones, los métodos de la invención pueden comprender una determinación cuantitativa de los niveles de expresión de ARNm. En una realización preferida, con el fin de proporcionar una distinción clara entre “expresión positiva” y “expresión negativa”, una determinación de la “expresión positiva” puede requerir la presencia de más de 50 copias del ARNm relevante (por ml de muestra o por volumen total de muestra), mientras que una determinación de la “expresión negativa” puede requerir la presencia de menos de 1 copia del ARNm relevante (por ml de muestra o por volumen total de muestra).

Los métodos de la invención implican la selección por ARNm de E6 utilizando una técnica que sea capaz de detectar específicamente ARNm de E6 de tipos de HPV asociados al cáncer, más preferiblemente de tipos de HPV asociados al cáncer de “alto riesgo”. Los métodos implican la selección por ARNm de E6 utilizando una técnica que sea capaz de detectar ARNm de E6 de los tipos de HPV 16, 18, 31, 33 y 45. El método detectará específicamente la expresión de ARNm de E6 de los cinco tipos. Sin embargo, las mujeres positivas para la expresión de E6 de otros tipos distintos de 16, 18, 31, 33 y 45, por ejemplo de 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 pueden tener aún “riesgo” de desarrollar carcinoma cervical. Puede llevarse a cabo la selección por la expresión de ARNm de E6 de uno o más de estos tipos de HPV, muy preferiblemente además de la selección por ARNm de E6 de los tipos de HPV 16, 18, 31, 33 y 45. Ciertos tipos de HPV presentan una notable distribución geográfica/poblacional.

Para evitar dudas, a no ser que se indique de otro modo, el término “ARNm de E6”, según se utiliza en la presente, incluye todos los transcritos de ARNm existentes de manera natural que contienen todo o parte del marco de lectura abierto de E6, incluyendo las variantes por ajuste que tienen lugar de forma natural, e incluye por tanto transcritos que contienen adicionalmente todo o parte del marco de lectura abierto de E7 (y además marcos de lectura abiertos adicionales). Los términos “ARNm de E6/E7”, “transcritos de E6/E7”, etc., son utilizados indistintamente con los términos “ARNm de E6”, “transcritos de E6” e incluyen también los transcritos de ARNm existentes de manera natural que contienen todo o parte del marco de lectura abierto de E6, incluyendo las variantes por ajuste existentes de forma natural, y transcritos que contienen todo o parte del marco de lectura abierto de E7. El término “expresión

de oncogenes”, a no ser que se indique de otro modo, se refiere también a transcritos de ARNm existentes de forma natural que contienen todo o parte del marco de lectura abierto de E6, incluyendo variantes por ajuste que tienen lugar de forma natural, y transcritos que contienen todo o parte del marco de lectura abierto de E7.

5 Se han descrito hasta ahora cuatro especies de ARNm de E6/E7 en células infectadas con HPV 16, a saber un transcrito de E6 no ajustado y tres transcritos ajustados denominados E6*I, E6*II y E6*III (Smotkin, D. y col., J. Virol., Marzo 1989, 63(3): 1441-7; Smotkin, D., Wettstein, F.O., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Julio 1986, 83(13): 4680-4; Doorbar, J. y col., Virology, Septiembre 1990, 178(1): 254-62; Cornelissen, M.T. y col., J. Gen. Virology, Mayo 1990, 71 (Pt 5): 1243-6; Johnson, M.A. y col., J. Gen. Virol., Julio 1990, 71 (Pt 7): 1473-9; Schneider-Maunoury, S. y col., J. Virol., Octubre 1987, 61(10): 3295-8; Sherman, L. y col., Int. J. Cancer, Febrero 1992, 50(3): 356-64). Los
10 cuatro transcritos son todos transcritos a partir de un único promotor (p97) situado justo corriente arriba del segundo ATG del ORF de E6.

En una realización, los métodos pueden comprender la selección por transcritos de E6 que contienen todo o parte
15 del marco de lectura abierto de E7. Esto puede ser realizado, por ejemplo, utilizando cebadores o sondas específicos para la región codificadora de E7.

En una realización adicional, los métodos pueden comprender la selección por la presencia de transcritos de E6 de “longitud completa”. En el caso de HPV 16, el término “transcritos de E6 de longitud completa” se refiere a
20 las posiciones que contienen toda la región desde el nucleótido (nt) 97 al nt 880 del ORF de E6, los nt 97 y 880 inclusive. Las posiciones de los nucleótidos están numeradas de acuerdo con la nomenclatura estándar del HPV (ver Human Papillomavirus Compendium OnLine, disponible en internet o en forma impresa en la base de datos de HV, Mail Stop K710, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM 87545, EE.UU.). La detección específica de transcritos de longitud completa puede ser realizada, por ejemplo, utilizando cebadores o sondas que sean específicos para la
25 región que está presente únicamente en los transcritos de E6 de longitud completa, y no en las variantes por ajuste. Tipos diferentes de HPV presentan patrones diferentes de expresión del ARNm de E6/E7. Los mapas de transcritos para varios tipos de HPV, incluyendo los tipos de HPV 16 y 31, que pueden ser utilizados para facilitar el diseño de sondas o cebadores para la detección de transcritos de E6/E7, están disponibles públicamente a través del Human Papillomavirus Compendium (igual que anteriormente).

30 En la presente se describen cebadores oligonucleotídicos de E6 que son adecuados para ser utilizados en la ampli-ficación de regiones del ARNm de E6 de varios tipos de HPV mediante NASBA o PCR.

Los métodos que implican la selección por la expresión de ARNm de L1 pueden comprender la selección por la
35 expresión del ARNm de L1 utilizando una técnica que sea capaz de detectar ARNm de L1 de sustancialmente todos los tipos conocidos de HPV o de al menos los tipos de HPV asociados al cáncer principales (por ejemplo, preferiblemente todos los tipos de HPV 16, 18, 31 y 33). En la presente se describen cebadores y sondas de L1 que son capaces de detectar ARNm de L1 de los tipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 y 51 en muestras cervicales.

40 Puede decirse que la detección de los transcritos de L1 detecta la “virulencia” del HPV, significando la presencia de actividad lítica del HPV. Puede decirse que la detección de los transcritos de E6/E7 detecta la “patogénesis” del HPV, ya que la expresión de estos ARNms es indicativa de acontecimientos moleculares asociados con el riesgo de desarrollar carcinoma.

45 En un estudio con 4589 mujeres fue posible detectar todos los casos excepto uno de lesiones CIN III o cáncer utilizando un método basado en el cribado por la expresión de ARNm de E6 y L1 (ver los Ejemplos acompañantes).

Los métodos anteriormente descritos pueden comprender el cribado por la expresión de transcritos de ARNm del gen p16^{ink4a} humano, además del cribado por la expresión de transcritos de L1 y/o E6 de HPV.

50 Un resultado positivo para la expresión del ARNm de p16^{ink4a} es considerado como una indicación adicional de riesgo de desarrollar carcinoma cervical.

El p16^{ink4a}, y los miembros de la familia relacionados, puede funcionar regulando la fosforilación y la actividad
55 supresora del crecimiento del producto del gen del retinoblastoma (RB). Como apoyo de esto, se ha encontrado que existe una relación inversa entre la expresión de la proteína p16^{ink4a} y la presencia de RB normal en líneas de células cancerosas seleccionadas; la proteína p16^{ink4a} es detectable cuando RB es mutante, se ha eliminado o inactivado, y está notablemente reducida o ausente en líneas celulares que contienen un RB normal. Kheif y col. (Kheif, S.N. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 4350-4354, 1996), encontraron que la proteína p16^{ink4a} se expresa en células de carcinoma cervical humano que contienen un RB mutante o un RB de tipo salvaje que está inactivado funcionalmente por E7. Demostraron también que la inactivación de RB se correlaciona con una regulación por incremento de p16^{ink4a}, confirmando un bucle de retroalimentación que implica a p16^{ink4a} y RB. Milde-Langosch y col. (Milde-Langosch, K. y col. (2001) Virchows Arch., 439: 55-61) encontraron que existían correlaciones significativas entre una potente expresión de p16 y la infección por HPV 16/18 y entre una potente expresión de p16 y la expresión de los oncogenes
65 E6/E7 de HPV 16/18. Klaes y col. (Klaes, R. y col. (2001) Int. J. Cancer, 92: 276-284) observaron una potente sobreexpresión del producto del gen p16^{ink4a} en 150 de 152 lesiones cervicales displásicas de grado alto (CIN II a cáncer invasivo), mientras que epitelio cervical normal o lesiones inflamatorias o metaplásicas no se teñían con el anticuerpo monoclonal E6H4 específico para p16^{ink4a}. Todas las lesiones clasificadas como CIN I asociadas con los

tipos LR-HPV no presentaban ninguna reactividad o únicamente una reactividad focal o esporádica, mientras que todas las lesiones clasificadas como CIN I, excepto dos de las mismas, asociadas con los tipos HR-HPV presentaban una tinción potente y difusa para p16^{ink4a}.

Los métodos de selección descritos pueden ser llevados a cabo en una preparación de ácido nucleico aislado de una muestra clínica o de una biopsia conteniendo células cervicales tomadas del sujeto bajo ensayo. Las muestras adecuadas que pueden ser utilizadas como fuente de ácido nucleico incluyen (pero no exclusivamente) muestras cervicales recogidas con un bastoncillo, biopsias cervicales, rascados cervicales, biopsias/verrugas cutáneas, también tejidos incluidos en parafina y células fijadas con formalina o metanol.

La preparación de ácido nucleico para ser sometida a selección utilizando el método descrito debe incluir ARNm, sin embargo no necesita ser una preparación de ARNm poli A+ purificado, y preparaciones de ARN total o preparaciones brutas de ácido nucleico total conteniendo ARN y ADN genómico, o incluso lisados celulares brutos, son también adecuadas como material de partida para una reacción de NASBA. Esencialmente, cualquier técnica conocida en el oficio para el aislamiento de una preparación de ácido nucleico que incluya ARNm puede ser utilizada para aislar ácido nucleico de una muestra de ensayo. Una técnica preferida es el método de aislamiento de "Boom" descrito en US-A-5.234.809 y EP-B-0389.063. Este método, que puede ser utilizado para aislar una preparación de ácido nucleico conteniendo ARN y ADN, está basado en las propiedades de las partículas de dióxido de silicio para unirse a ácidos nucleicos en presencia del agente caotrópico tiocianato de guanidina (GuSCN).

Los métodos de la invención están basados en la determinación de transcripción activa del genoma del HPV en células cervicales. Los métodos no están limitados con respecto a la técnica de amplificación precisa utilizada para detectar la expresión del ARNm. Se conocen en el oficio muchas técnicas para la detección de secuencias específicas de ARNm y pueden ser utilizadas de acuerdo con la invención.

La expresión del ARNm es detectada por medio de una técnica de amplificación, muy preferiblemente una amplificación isotérmica tal como NASBA, la amplificación mediada por transcripción, la amplificación mediada por una señal de la tecnología del ARN, la amplificación en fase de solución isotérmica, etc. Todos estos métodos son bien conocidos en la técnica. Más preferiblemente la expresión de ARNm es detectada mediante una amplificación isotérmica en combinación con la detección del producto de amplificación en tiempo real. La combinación más preferida es la amplificación mediante NASBA, acoplada con la detección en tiempo real del producto de amplificación utilizando la tecnología de sondas moleculares fluorescentes ("beacons"), según está descrito por Leone y col., Nucleic Acids Research, 1998, Vol. 26, 2150-2155.

Los métodos para la detección de HPV en una muestra de ensayo utilizando la técnica NASBA comprenderán generalmente las etapas siguientes:

(a) la preparación de un medio de reacción conteniendo pares de cebadores adecuados, una ADN polimerasa dirigida por ARN, una ribonucleasa que hidrolice la hebra de ARN de un híbrido ARN-ADN sin hidrolizar ARN o ADN de hebra sencilla o de doble hebra, una ARN polimerasa que reconozca dicho promotor y trifosfatos de ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos;

(b) la incubación del medio de reacción con una preparación de ácido nucleico aislado de una muestra de ensayo sospechosa de contener HPV, bajo condiciones de reacción que permitan una reacción de amplificación mediante NASBA; y

(c) la detección y/o la medida cuantitativa de cualquier producto específico del HPV de la reacción de amplificación por NASBA.

La detección del(los) producto(s) específico(s) de la reacción del NASBA (esto es copias sentido y/o antisentido del ARN diana) puede ser llevada a cabo de varias maneras diferentes. En un procedimiento, el(los) producto(s) del NASBA puede(n) ser detectado(s) con la utilización de una sonda de hibridación específica del HPV capaz de hibridar específicamente con el producto del NASBA. La sonda de hibridación puede estar ligada a una marca reveladora, por ejemplo un compuesto fluorescente, luminiscente, radiactivo o quimioluminiscente o a una marca enzimática o a cualquier otro tipo de marca conocida por las personas con experiencia habitual en la técnica. La naturaleza exacta de la marca no es crítica, pero debe ser capaz de producir una señal detectable por un medio externo, ya sea por sí misma o junto con una o más sustancias adicionales (por ejemplo el sustrato de un enzima).

Un método de detección preferido es el denominado "NASBA en tiempo real" que permite la monitorización continua de la formación del producto de la reacción del NASBA a lo largo del curso de la reacción. En una realización preferida, esto puede ser conseguido utilizando una sonda "molecular fluorescente" ("beacon") que contenga una secuencia específica del HPV capaz de hibridarse con el producto del NASBA, una secuencia oligonucleotídica que forme un dúplice troncal y un par de restos fluorescentes/amortiguadores, según se conoce en la técnica y se describe en la presente. Si la sonda fluorescente molecular es añadida a la mezcla de reacción antes de la amplificación, puede ser posible monitorizar la formación del producto del NASBA en tiempo real (Leone y col., Nucleic Acids Research, 1998, Vol. 26, 2150-2155). Hay kits de reactivos e instrumentación disponibles comercialmente para llevar a cabo la detección mediante NASBA en tiempo real (por ejemplo NucliSensTM EasyQ System, de Organon Teknika).

ES 2 282 599 T3

En un procedimiento adicional, la tecnología de sondas fluorescentes moleculares (“beacons”) puede ser incorporada al oligonucleótido cebador 2, permitiendo la monitorización en tiempo real de la reacción del NASBA sin la necesidad de una sonda de hibridación separada.

- 5 En un procedimiento adicional más, los productos de la reacción del NASBA pueden ser monitorizados utilizando una sonda de detección genérica marcada que hibride con una secuencia de nucleótidos del extremo 5' del oligonucleótido cebador 2. Esto es equivalente al sistema de detección “NucliSens™” suministrado por Organon Teknika. En este sistema, la especificidad para los productos del NASBA derivados del ARNm del HPV diana puede ser conferida por la utilización de sondas de captura específicas para el HPV que contengan oligonucleótidos sonda, según se describe en la presente, unidos a un soporte sólido tal como una microesfera magnética. Muy preferiblemente, la sonda de detección genérica marcada es la sonda de detección ECL™ suministrada por Organon Teknika. Los amplicones del NASBA son hibridados a las sondas de captura específicas para el HPV y a la sonda ECL genérica (a través de una secuencia complementaria en el cebador 2). Después de la hibridación, los complejos esfera/amplicón/sonda ECL pueden ser capturados en el electrodo magnético de un lector de ECL automático (por ejemplo el lector NucliSens™ suministrado por Organon Teknika). Posteriormente, un pulso de voltaje desencadena la reacción de ECL™.
- 10
- 15

- La detección de ARNm del HPV tiene también relevancia clínica en cánceres distintos del carcinoma cervical incluyendo, por ejemplo, el carcinoma de cabeza y cuello, el carcinoma oral y de lengua, el carcinoma cutáneo y el carcinoma anal y vaginal. La detección del ARNm de HPV puede ser también muy útil en el diagnóstico de micrometástasis en los nódulos linfáticos de la parte inferior del organismo.
- 20

- Los kits para utilización en la detección de transcritos de los genes L1 y E6 del HPV contienen al menos un par de cebadores adecuado para ser utilizado en la amplificación de una región de los transcritos de L1 de al menos los tipos de HPV 16, 18, 31 y 33, y preferiblemente también del HPV 45, y uno o más pares de cebadores que permitan la amplificación de una región de los transcritos de E6 de los tipos de HPV 16, 18, 31 y 33, y preferiblemente también de HPV 45.
- 25

- Un “par de cebadores” significa un par de cebadores que pueden ser utilizados en combinación para amplificar una región específica del ARNm de L1 o E6 utilizando cualquier técnica conocida de amplificación de ácidos nucleicos. En las realizaciones preferidas, los pares de cebadores incluidos en el kit serán adecuados para su utilización en la técnica de amplificación mediante NASBA o en técnicas de amplificación isotérmicas similares.
- 30

- Los cebadores individuales que constituyen cada par de cebadores incluido en el kit pueden ser suministrados separadamente (por ejemplo un recipiente separado para cada cebador) o, más preferiblemente, pueden ser suministrados mezclados en un único recipiente. Combinaciones de dos o más pares de cebadores pueden ser suministradas ya mezcladas en un único recipiente del kit. Puede ser conveniente suministrar dos o más pares de cebadores en un único recipiente cuando las dos o más reacciones de amplificación van a ser “multiplexadas”, lo que significa realizadas simultáneamente en un único recipiente de reacción.
- 35

- El(los) par(es) de cebadores adecuado(s) para ser utilizado(s) en la amplificación de una región de transcritos de E6 debería(n) facilitar la amplificación de una región del ARNm de E6 de los principales tipos de HPV asociados con cáncer 16, 18, 31, 33 y también de HPV 45. Existen varias formas diferentes mediante las cuales puede conseguirse esto.
- 40

- El kit puede contener pares de cebadores separados específicos para cada uno de los tipos de HPV 16, 18, 31, 33 y 45. Estos pares de cebadores pueden ser suministrados en el kit en recipientes separados, o pueden ser suministrados como mezclas de dos o más pares de cebadores en un único recipiente, por ejemplo para permitir la “simultaneidad” de las reacciones de amplificación.
- 45

- El kit puede contener un solo par de cebadores capaces de amplificar una región del gen E6 de los tipos de HPV 16, 18, 31, 33 y también del HPV 45, que permita de este modo la amplificación de los cinco tipos en una sola reacción de amplificación. Esto podría conseguirse, por ejemplo, con la utilización de un par de cebadores degenerados o por la selección de una región del ARNm de E6 que esté muy conservada entre los tipos de HPV.
- 50

- El par de cebadores para E6 puede corresponder a cualquier región del ARNm de E6, y puede permitir la amplificación de todo o de parte del marco de lectura abierto de E6 y/o del marco de lectura abierto de E7.
- 55

- El(los) par(es) de cebadores adecuado(s) para ser utilizado(s) en la amplificación de una región de los transcritos de L1 debería(n) ser capaz(es) de amplificar una región del ARNm de L1 de al menos los tipos de HPV asociados con cáncer principales 16, 18, 31 y 33, y preferible también de HPV 45, y preferiblemente será(n) adecuado(s) para ser utilizado(s) en la amplificación de una región de los ARNMs de L1 de sustancialmente todos los tipos conocidos de HPV. Con la utilización de tales cebadores es posible analizar la transcripción activa del ARNm de L1 de múltiples tipos de HPV en una única reacción de amplificación.
- 60

- Es posible diseñar cebadores capaces de detectar transcritos de L1 de múltiples tipos de HPV mediante la selección de regiones del transcrito de L1 que estén muy conservadas.
- 65

ES 2 282 599 T3

En un procedimiento adicional, puede conseguirse la especificidad para múltiples tipos de HPV mediante la utilización de cebadores oligonucleotídicos degenerados o de mezclas complejas de polinucleótidos que presenten pequeñas variaciones de la secuencia, correspondientes preferiblemente a sitios de variación de la secuencia entre genotipos de HPV. La razón fundamental para la utilización de tales cebadores degenerados o mezclas es que la mezcla puede
5 contener al menos un par de cebadores capaz de detectar cada tipo de HPV.

En un procedimiento adicional más, la especificidad para múltiples tipos de HPV puede ser conseguida mediante la incorporación en los cebadores de uno o más nucleótidos de inosina, preferiblemente en los lugares de variación de las secuencias entre los genotipos de HPV.
10

Los pares de cebadores para E6 y L1 pueden ser suministrados en recipientes separados dentro del kit, o el(los) par(es) de cebador(es) para L1 puede(n) ser suministrado(s) como una mezcla con uno o más pares de cebadores para E6 en un único recipiente.

Los kits pueden contener además una o más sondas adecuadas para ser utilizadas en la detección de los productos de las reacciones de amplificación llevadas a cabo utilizando los pares de cebadores incluidos en el kit. La(s) sonda(s) puede(n) ser suministrada(s) como un reactivo separado en el kit. Alternativamente, la(s) sonda(s) puede(n) ser suministrada(s) como una mezcla con uno o más pares de cebadores.
15

Los cebadores y las sondas incluidos en el kit son preferiblemente moléculas de ADN de hebra sencilla. Pueden utilizarse también polinucleótidos sintéticos no naturales que conserven la capacidad de apareamiento de bases con una molécula de ácido nucleico complementaria, incluyendo oligonucleótidos sintéticos que incorporen bases modificadas y oligonucleótidos sintéticos en los que los enlaces entre los nucleósidos individuales incluyan enlaces distintos de los enlaces fosfodiéster. Los cebadores y las sondas pueden ser producidos de acuerdo con técnicas bien conocidas en el oficio, tal como mediante síntesis química utilizando aparatos y protocolos estándar para la síntesis de oligonucleótidos.
20 25

Los cebadores y las sondas serán típicamente polinucleótidos de hebra sencilla aislados de no más de 100 bases de longitud, más típicamente de menos de 55 bases de longitud. Para evitar dudas, se manifiesta en la presente que los términos “cebador” y “sonda” excluyen genomas de HPV de longitud completa existentes de forma natural.
30

Pueden incluirse en el kit varios tipos generales de cebadores y sondas oligonucleotídicos que incorporen secuencias específicas del HPV. Típicamente, tales cebadores y sondas pueden contener secuencias adicionales que no sean del HPV, por ejemplo secuencias que sean requeridas para una reacción de amplificación o que faciliten la detección de los productos de la reacción de amplificación.
35

El primer tipo de cebadores son los oligonucleótidos cebadores 1 (referidos también en la presente como cebadores P1 del NASBA), que son oligonucleótidos de generalmente 50 bases de longitud aproximadamente, que contienen una media de 20 bases aproximadamente en el extremo 3' y que son complementarios a una región del ARNm diana. Los oligonucleótidos adecuados para ser utilizados como cebadores P1 del NASBA son denominados “P1/PCR” en la Tabla 1. Los oligonucleótidos cebadores P1 tienen la estructura general X₁-SEQ, en la cual SEQ representa una secuencia específica para HPV y X₁ es una secuencia que contiene un promotor que es reconocido por una ARN polimerasa específica. Se prefiere la utilización en los oligonucleótidos de la invención de promotores de bacteriófagos, por ejemplo los promotores de T7, T3 y SP6, ya que proporcionan las ventajas de un elevado nivel de transcripción que depende únicamente de la unión de la ARN polimerasa apropiada. En una realización preferida, la secuencia “X₁” puede comprender la secuencia AATTCTAATACGACTCACTATAGGG o la secuencia AATTCTAATACGACTCACTA TAGGGAGAAGG. Estas secuencias contienen un promotor de T7, que incluye el sitio de inicio de la transcripción para la ARN polimerasa de T7. Las secuencias específicas para HPV en los cebadores denominados en la Tabla 1 como “P1/PCR” pueden ser también adaptadas para utilización en cebadores estándar de PCR. Cuando estas secuencias son
40 45 50 utilizadas como la base de los cebadores P1 del NASBA, tienen la estructura general X₁-SEQ, según se definió anteriormente. La secuencia del promotor X₁ es esencial en un cebador P1 del NASBA. Sin embargo, cuando se utilizan las mismas secuencias como la base de cebadores de PCR estándar, no es necesario incluir X₁.

Un segundo tipo de cebadores son los oligonucleótidos cebadores 2 del NASBA (referidos también en la presente como cebadores P2 del NASBA) que contienen generalmente una secuencia de 20 bases aproximadamente sustancialmente idéntica a una región del ARNm diana. Las secuencias oligonucleotídicas denominadas en la Tabla 1 como “P2/PCR” son adecuadas para ser utilizadas en cebadores P2 del NASBA y en cebadores estándar para PCR.
55

Los oligonucleótidos destinados a ser utilizados como cebadores P2 del NASBA pueden contener además, en una realización particular pero no limitante, una secuencia de nucleótidos en el extremo 5' que no esté relacionada con el ARNm diana pero que sea capaz de hibridar con una sonda de detección genérica. La sonda de detección estará preferiblemente marcada con, por ejemplo, una marca fluorescentes, luminiscente o enzimática. En una realización, la sonda de detección está marcada con una marca que permite la detección utilizando la tecnología ECLTM, aunque se apreciará que la invención no está limitada de ninguna manera a este método de detección particular. En una realización preferida, el extremo 5' de los oligonucleótidos cebadores 2 puede contener la secuencia GATGCAAGGTCGCATAT GAG. Esta secuencia es capaz de hibridar con una sonda genérica ECLTM disponible comercialmente en Organon Teknika que tiene la estructura siguiente:
60 65

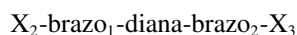


En una realización diferente, el oligonucleótido cebador 2 puede incorporar la tecnología de “sondas moleculares fluorescentes” (“beacons”), que es conocida en la técnica y está descrita en, por ejemplo, WO 95/13399 por Tyagi y Kramer, Nature Biotechnology, 14: 303-308, 1996, para permitir la monitorización en tiempo real de la reacción del NASBA.

Pueden estar también incluidos en el kit oligonucleótidos sonda específicos de la diana. Los oligonucleótidos sonda contienen generalmente una secuencia de 20-25 bases aproximadamente sustancialmente idéntica a una región del ARNm diana, o al complemento de la misma. Ejemplos de secuencias oligonucleotídicas específicas para el HPV que son adecuadas para ser utilizadas como sondas están designadas como “PO” en la Tabla 1. Los oligonucleótidos sonda pueden ser utilizados como sondas de hibridación específicas de la diana para la detección de los productos de una reacción de NASBA o PCR. A este respecto, los oligonucleótidos sonda pueden ser acoplados a un soporte sólido, tal como esferas paramagnéticas, para formar una sonda de captura (ver más adelante). En una realización preferida, el extremo 5' del oligonucleótido sonda puede estar marcado con biotina. La adición de una marca de biotina facilita la unión de la sonda a un soporte sólido a través de un enlace biotina/estreptavidina o biotina/avidina.

Las sondas específicas de la diana que permiten la detección en tiempo real de los productos de amplificación pueden incorporar la tecnología de las “sondas moleculares fluorescentes” (“beacons”) que es conocida en la técnica y está descrita, por ejemplo, por Tyagi y Kramer, Nature Biotechnology, 14: 303-308, 1996 y en WO 95/13399. Ejemplos de secuencias oligonucleotídicas específicas para el HPV adecuadas para ser utilizadas como sondas moleculares fluorescentes son denominadas “MB” en la Tabla 1.

El término “sondas moleculares fluorescentes” (“beacons”), según es utilizado en la presente, quiere indicar moléculas que tienen la estructura:



en la cual “diana” representa una secuencia de nucleótidos específica de la diana, “X₂” y “X₃” representan un resto fluorescente y un resto amortiguador capaz de amortiguar sustancialmente o completamente la fluorescencia procedente del resto fluorescente cuando los dos son mantenidos juntos en una estrecha proximidad y “brazo₁” y “brazo₂” representan secuencias complementarias capaces de formar un dúplice troncal.

Las combinaciones preferidas de las secuencias “brazo₁” y “brazo₂” son según sigue, aunque éstas tienen la intención de ser ilustrativas más que de limitantes de la invención:

cgcattg-SEQ-cattgcg

ccagct-SEQ-agctgg

cacgc-SEQ-gcgtg

cgcattg-SEQ-cgcattg

ccgtcg-SEQ-cgacgg

cggacc-SEQ-ggtccg

ccgaagg-SEQ-ccttcgg

cacgtcg-SEQ-cgacgtg

cgcagg-SEQ-gctgcg

ccaagc-SEQ-gcttgg

ccaagcg-SEQ-cgcttgg

cccagg-SEQ-gctggg

ccaaagc-SEQ-gctttgg

cctgc-SEQ-gcagg

ccaccc-SEQ-gggtgg

ccaagcc-SEQ-ggcttgg

ccagcg-SEQ-cgctgg

cgcattg-SEQ-cattgcg

La utilización de la tecnología de sondas moleculares fluorescentes (“beacons”) permite la monitorización en tiempo real de las reacciones de amplificación, por ejemplo la amplificación mediante NASBA (ver Leone y col., Nucleic Acids Research, 1998, Vol. 26, pp. 2150-2155). Las sondas moleculares fluorescentes (“beacons”) incluyen generalmente secuencias complementarias que flanquean a la secuencia específica para el HPV, representadas en la presente por la notación brazo₁ y brazo₂, que son capaces de hibridar entre sí para formar una estructura de dúplice troncal. Las secuencias exactas del brazo₁ y el brazo₂ no son material de la invención, excepto por el requisito de que estas secuencias deben ser capaces de formar un dúplice troncal cuando la sonda no está unida a una secuencia del HPV diana.

Las sondas moleculares fluorescentes (“beacons”) incluyen también un resto fluorescente y un resto amortiguador, estando representados en la presente los restos fluorescente y amortiguador por la notación X₂ y X₃. Como apreciará el lector experto, los restos fluorescente y amortiguador son seleccionados de tal manera que el resto amortiguador sea capaz de amortiguar sustancialmente o completamente la fluorescencia procedente del resto fluorescente cuando los dos restos estén muy próximos, por ejemplo cuando la sonda esté en la conformación “cerrada” de horquilla en ausencia de la secuencia diana. Después de la unión a la secuencia diana, los restos fluorescente y amortiguador se mantienen separados, de tal manera que la fluorescencia procedente del resto fluorescente ya no resulta amortiguada.

Muchos ejemplos de pares de restos amortiguador/fluorescente adecuados que pueden ser utilizados de acuerdo con la invención son conocidos en la técnica (ver WO 95/13399, Tyagi y Kramer, *ibid.*). Puede utilizarse un amplio rango de fluoróforos de muchos colores diferentes, incluyendo por ejemplo el ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), fluoresceína, FAM y Rojo Texas (ver Tyagi, Bratu y Kramer, 1998, Nature Biotechnology, 16, 49-53). La utilización de sondas marcadas con diferentes fluoróforos coloreados permite la detección “simultánea” de dos o más sondas diferentes en un único recipiente de reacción. Un amortiguador preferido es el ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL), un cromóforo no fluorescente, que sirve como amortiguador “universal” para un amplio rango de fluoróforos. Los restos fluorescente y amortiguador pueden estar unidos covalentemente a la sonda en cualquier orientación, ya sea con el fluorescente en o cerca del extremo 5' y el amortiguador en o cerca del extremo 3', o viceversa. Los protocolos para la síntesis de sondas moleculares fluorescentes (“beacons”) son conocidos en la técnica. Un protocolo detallado para la síntesis está proporcionado en una publicación titulada “Molecular Beacons: Hybridization Probes for Detection of Nucleic Acids in Homogenous Solutions” de Sanjay Tyagi y col., Department of Molecular Genetics, Public Health Research Institute, 455 First Avenue New York, NY 10016, EE.UU., que está disponible “on line” a través de la página web del PHRI (en www.phri.nyu.edu o en www.molecular-beacons.org).

Pueden utilizarse combinaciones adecuadas de los cebadores P1 del NASBA y P2 del NASBA para dirigir una reacción de amplificación mediante NASBA. Para dirigir una reacción de amplificación mediante NASBA, los oligonucleótidos cebador 1 y cebador 2 deben ser capaces de estimular la síntesis de un ADN de doble hebra a partir de una región diana del ARNm. Para que esto ocurra, los oligonucleótidos cebador 1 y cebador 2 deben contener secuencias específicas de la diana que sean complementarias a regiones de la hebra sentido y antisentido del ARNm diana, respectivamente.

En la primera fase del ciclo de amplificación mediante NASBA, la denominada fase “no cíclica”, el oligonucleótido cebador 1 se hibrida a una secuencia complementaria en el ARNm diana y su extremo 3' es extendido por la acción de una ADN polimerasa dependiente de ARN (por ejemplo una transcriptasa inversa) para dar lugar a la síntesis de una primera hebra de ADNc. La hebra de ARN del híbrido ARN:ADN resultante es posteriormente digerida, por ejemplo mediante la acción de ARNasa H, para dejar un ADN de hebra sencilla. El oligonucleótido cebador 2 se hibrida a una secuencia complementaria hacia el extremo 3' de este ADN de hebra sencilla y su extremo 3' es extendido (por la acción de la transcriptasa inversa), formando un ADN de doble hebra. La ARN polimerasa es luego capa de transcribir múltiples copias de ARN a partir de la secuencia promotora ahora transcripcionalmente activa dentro del ADN de doble hebra. Este transcrito de ARN, que es antisentido respecto al ARNm diana original, puede actuar como molde para una ronda posterior de reacciones de NASBA, con el cebador 2 hibridándose al ARN y cebando la síntesis de la primera hebra de ADNc y el cebador 1 estimulando la síntesis de la segunda hebra de ADNc. Los principios generales de la reacción del NASBA son bien conocidos en la técnica (ver Compton, J., Nature, 350: 91-92).

Los oligonucleótidos sonda específicos de la diana descritos en la presente pueden ser también unidos a un soporte sólido, tal como microesferas magnéticas, y ser utilizados como “sondas de captura” para inmovilizar el producto de la reacción de amplificación mediante NASBA (un ARN de hebra sencilla). Las sondas “moleculares fluorescentes” (“beacons”) específicas de la diana descritas en la presente pueden ser utilizadas para la monitorización en tiempo real de la reacción del NASBA.

Los kits pueden incluir también un control positivo que contenga ARNm de E6 y/o L1 de un tipo de HPV conocido. Controles adecuados incluyen, por ejemplo, extractos de ácido nucleico preparados a partir de líneas celulares infectadas con tipos conocidos de HPV (por ejemplo HeLa, CaSki).

Los kits pueden contener además cebadores de amplificación para control interno, por ejemplo cebadores específicos para ARN de U1A humano.

Los kits que contienen los cebadores (y opcionalmente sondas) adecuados para ser utilizados en la amplificación mediante NASBA pueden contener además una mezcla de enzimas requeridos para la reacción del NASBA, por

ES 2 282 599 T3

ejemplo una mezcla enzimática conteniendo una ADN polimerasa dirigida por ARN (por ejemplo una transcriptasa inversa), una ribonucleasa que hidrolice la hebra de ARN de un híbrido ARN-ADN sin hidrolizar ARN o ADN de hebra sencilla o de doble hebra (por ejemplo ARNasa H) y una ARN polimerasa. La ARN polimerasa debe ser una que reconozca la secuencia promotora presente en la región 5' terminal de los cebadores P1 del NASBA suministrados en el kit de reactivos. El kit puede contener también un suministro de tampón para NASBA que contenga los ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos requeridos para la síntesis de ARN y ADN. La composición de un tampón estándar para la reacción del NASBA será bien conocida por los expertos en la técnica (ver también Leone y col., *ibid.*).

TABLA 1

Secuencias específicas de E6 para ser incluidas en los cebadores y sondas de NASBA/PCR

SEC ID	Tipo de cebador/sonda	Secuencia	Tipo de HPV	nt
1	P2/PCR	CCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTA	16	116
2	P1/PCR	X ₁ -ACGGTTTGTGTATTGCTGTTC	16	368
3	P1/PCR	CCACAGGAGCGACCCAGAAA	16	116
4	P1/PCR	X ₁ -GGTTTGTGTATTGCTGTTC	16	368
5	P1/PCR	X ₁ -ATCCCATCTCTATATACTA	16	258
6	P1/PCR	X ₁ -TCACGTCGCAGTAACTGT	16	208
7	P1/PCR	X ₁ -TTGCTTGCACTACACACA	16	191
8	P1/PCR	X ₁ -TGCAGTACACACATTCTA	16	186
9	P1/PCR	X ₁ -GCAGTACACACATTCTAA	16	185
10	P2/PCR	ACAGTTATGCACAGAGCT	16	142
11	P2/PCR	ATATTAGAATGTGTGTAC	16	182
12	P2/PCR	TTAGAATGTGTGTACTGC	16	185
13	P2/PCR	GAATGTGTGTACTGCAAG	16	188
14	PO	ACAGTTATGCACAGAGCT	16	142
15	PO	ATATTAGAATGTGTGTAC	16	182
16	PO	TTAGAATGTGTGTACTGC	16	185
17	PO	GAATGTGTGTACTGCAAG	16	188
18	PO	CTTTGCTTTTCGGGATTATGC	16	235
19	PO	TATGACTTTGCTTTTCGGGA	16	230
20	MB	X ₂ -brazo ₁ -TATGACTTTGCTTTTCGGGA-brazo ₂ -X ₃	16	230
21	P2/PCR	CAGAGGAGGAGGATGAAATAGTA	16	656
22	P1/PCR	X ₁ -GCACAACCGAAGCGTAGAGTCACAC	16	741
23	PO	TGGACAAGCAGAACCGACAGAGC	16	687
24	P2/PCR	CAGAGGAGGAGGATGAAATAGA	16	656
25	P1/PCR	X ₁ -GCACAACCGAAGCGTAGAGTCA	16	741

ES 2 282 599 T3

SEC ID	Tipo de cebador/sonda	Secuencia	Tipo de HPV	nt
26	PO	AGCAGAACCGGACAGAGCCCATTA	16	693
27	P2/PCR	ACGATGAAATAGATGGAGTT	18	702
28	P1/PCR	X ₁ -CACGGACACACAAAGGACAG	18	869
29	PO	AGCCGAACCACAACGTCACA	18	748
30	P2/PCR	GAAAACGATGAAATAGATGGAG	18	698
31	P1/PCR	X ₁ -ACACCACGGACACACAAAGGACAG	18	869
32	PO	GAACCACAACGTCACACAATG	18	752
33	MB	X ₂ -brazo ₁ -GAACCACAACGTCACACAATG-brazo ₂ -X ₃	18	752
34	P2/PCR	TTCCGGTTGACCTTCTATGT	18	651
35	P1/PCR	X ₁ -GGTCGTCTGCTGAGCTTTCT	18	817
36	P2/PCR	GCAAGACATAGAAATAACCTG	18	179
37	P1/PCR	X ₁ -ACCCAGTGTTAGTTAGTT	18	379
38	PO	TGCAAGACAGTATTGGAAC	18	207
39	P2/PCR	GGAAATACCCTACGATGAAC	31	164
40	P1/PCR	X ₁ -GGACACAACGGTCTTTGACA	31	423
41	PO	ATAGGGACGACACACCACACGGAG	31	268
42	P2/PCR	GGAAATACCCTACGATGAAC	31	164
43	P1/PCR	X ₁ -CTGGACACAACGGTCTTTGACA	31	423
44	PO	TAGGGACGACACACCACACGGAG	31	269
45	P2/PCR	ACTGACCTCCACTGTTATGA	31	617
46	P1/PCR	X ₁ -TATCTACTTGTGTGCTCTGT	31	766
47	PO	GACAAGCAGAACCGGACACATC	31	687
48	P2/PCR	TGACCTCCACTGTTATGAGCAATT	31	619
49	P1/PCR	X ₁ -TGCGAATATCTACTTGTGTGCTCT GT	31	766
50	PO	GGACAAGCAGAACCGGACACATCCAA	31	686
51	MB	X ₂ -brazo ₁ -GGACAAGCAGAACCGGACACATCCAA-brazo ₂ -X ₃	31	686
52	P2/PCR	ACTGACCTCCACTGTTAT	31	617
53	P1/PCR	X ₁ -CACGATTCCAAATGAGCCCAT	31	809
54	P2/PCR	TATCCTGAACCAACTGACCTAT	33	618
55	P1/PCR	X ₁ -TTGACACATAAACGAACTG	33	763
56	PO	CAGATGGACAAGCACAACC	33	694

ES 2 282 599 T3

SEC ID	Tipo de cebador/sonda	Secuencia	Tipo de HPV	nt
57	P2/PCR	TCCTGAACCAACTGACCTAT	33	620
58	P1/PCR	X ₁ -CCCATAAGTAGTTGCTGTAT	33	807
59	PO	GGACAAGCACAACCAGCCACAGC	33	699
60	MB	X ₂ -brazo ₁ -GGACAAGCACAACCAGCCACAGC-brazo ₂ -X ₃	33	699
61	P2/PCR	GACCTTTGTGTCTCAAGAA	33	431
62	P1/PCR	X ₁ -AGGTCAAGTTGGTTCAGGATA	33	618
63	PO	AGAAACTGCACTGTGACGTGT	33	543
64	P2/PCR	ATTACAGCGGAGTGAGGTAT	35	217
65	P1/PCR	X ₁ -GTCTTTGCTTTTCAACTGGA	35	442
66	PO	ATAGAGAAGGCCAGCCATAT	35	270
67	P2/PCR	TCAGAGGAGGAGGAAGATACTA	35	655
68	P1/PCR	X ₁ -GATTATGCTCTCTGTGAACA	35	844
69	P2/PCR	CCCGAGGCAACTGACCTATA	35	610
70	P1/PCR	X ₁ -GTCAATGTGTGTGCTCTGTA	35	770
71	PO	GACAAGCAAAACCAGACACCTCCAA	35	692
72	PO	GACAAGCAAAACCAGACACC	35	692
73	P2/PCR	TTGTGTGAGGTGCTGGAAGAAT	52	144
74	P1/PCR	X ₁ -CCCTCTCTTCTAATGTTT	52	358
75	PO	GTGCCTACGCTTTTATCTA	52	296
76	P2/PCR	GTGCCTACGCTTTTATCTA	52	296
77	P1/PCR	X ₁ -GGGGTCTCCAACACTCTGAACA	52	507
78	PO	TGCAAACAAGCGATTCTCA	52	461
79	P2/PCR	TCAGGCGTTGGAGACATC	58	157
80	P1/PCR	X ₁ -AGCAATCGTAAGCACACT	58	301
81	P2/PCR	TCTGTGCATGAAATCGAA	58	173
82	P1/PCR	X ₁ -AGCACACTTTACATACTG	58	291
83	PO	TGAAATGCGTTGAATGCA	58	192
84	PO	TTGCAGCGATCTGAGGTATATG	58	218
85	P2/PCR	TACACTGCTGGACAACAT	B (11)	514
86	P1/PCR	X ₁ -TCATCTTCTGAGCTGTCT	B (11)	619
87	P2/PCR	TACACTGCTGGACAACATGCA	B (11)	514

ES 2 282 599 T3

SEC ID	Tipo de cebador/sonda	Secuencia	Tipo de HPV	nt
88	P1/PCR	X ₁ -GTCACATCCACAGCAACAGGTCA	B (11)	693
89	PO	GTAGGGTTACATTGCTATGA	B (11)	590
90	PO	GTAGGGTTACATTGCTATGAGC	B (11)	590
91	P2/PCR	TGACCTGTTGCTGTGGATGTGA	B (11)	693
92	P1/PCR	X ₁ -TACCTGAATCGTCCGCCAT	B (11)	832
93	PO	ATWGTGTGTCCCATCTGC	B (11)	794
94	P2/PCR	CATGCCATAAATGTATAGA	C (18 39 45)	295
95	P1/PCR	X ₁ -CACCGCAGGCACCTTATTAA	C (18 39 45)	408
96	PO	AGAATTAGAGAATTAAGA	C (18 39 45)	324
97	P2/PCR	GCAGACGACCACTACAGCAAA	39	210
98	P1/PCR	X ₁ -ACACCGAGTCCGAGTAATA	39	344
99	PO	ATAGGGACGGGAACCACT	39	273
100	P2/PCR	TATTACTCGGACTCGGTGT	39	344
101	P1/PCR	X ₁ -CTTGGGTTTCTCTTCGTGTTA	39	558
102	PO	GGACCACAAAACGGGAGGAC	39	531
103	P2/PCR	GAAATAGATGAACCCGACCA	39	703
104	P1/PCR	X ₁ -GCACACCACGGACACACAAA	39	886
105	PO	TAGCCAGACGGGATGAACCACAGC	39	749
106	P2/PCR	AACCATTGAACCCAGCAGAAA	45	430
107	P1/PCR	X ₁ -TCTTTCTTGCCGTGCCTGGTCA	45	527
108	P2/PCR	GTACCGAGGGCAGTGTAAATA	45	500
109	P2/PCR	AACCATTGAACCCAGCAGAAA	45	430
110	P1/PCR	X ₁ -TCTTTCTTGCCGTGCCTGGTCA	45	527
111	P2/PCR	GAAACCATTGAACCCAGCAGAAAA	45	428
112	P1/PCR	X ₁ -TTGCTATACTTGTGTTTCCTACG	45	558
113	PO	GTACCGAGGGCAGTGTAAATA	45	500
114	PO	GGACAAACGAAGATTTCACA	45	467
115	P2/PCR	GTTGACCTGTTGTGTACCAGCAAT	45	656
116	P1/PCR	X ₁ -CACCGACACACAAAGGACAAG	45	868

ES 2 282 599 T3

SEC ID	Tipo de cebador/sonda	Secuencia	Tipo de HPV	nt
117	P2/PCR	CTGTTGACCTGTTGTGTACGA	45	654
118	P1/PCR	X ₁ -CCACGGACACACAAAGGACAAG	45	868
119	P2/PCR	GTTGACCTGTTGTGTACGA	45	656
120	P1/PCR	X ₁ -ACGGACACACAAAGGACAAG	45	868
121	PO	GAGTCAGAGGAGGAAAACGATG	45	686
122	PO	AGGAAAACGATGAAGCAGATGGAGT	45	696
123	PO	ACAACCTACCAGCCCCGACGAGCCGAA	45	730
124	P2/PCR	GGAGGAGGATGAAGTAGATA	51	658
125	P1/PCR	X ₁ -GCCCATTAACATCTGCTGTA	51	807
126	P2/PCR	AGAGGAGGAGGATGAAGTAGATA	51	655
127	P1/PCR	X ₁ -ACGGGCAAACAGGCTTAGT	51	829
128	PO	GCAGGTGTTCAAGTGTAGTA	51	747
129	PO	TGGCAGTGGAAGCAGTGGAGACA	51	771
130	P2/PCR	TTGGGGTGCTGGAGACAAACATCT	56	519
131	P1/PCR	X ₁ -TTCATCCTCATCCTCATCCTCTGA	56	665
132	P2/PCR	TGGGGTGCTGGAGACAAACATC	56	520
133	P1/PCR	X ₁ -CATCCTCATCCTCATCCTCTGA	56	665
134	P2/PCR	TTGGGGTGCTGGAGACAAACAT	56	519
135	P1/PCR	X ₁ -CCACAACTTACACTCACAACA	56	764
136	PO	AAAGTACCAACGCTGCAAGACGT	56	581
137	PO	AGAATAACACCTCAAACAGAAAT	56	610
138	PO	AGTACCAACGCTGCAAGACGTT	56	583
139	P1/PCR	X ₁ -TTGGACAGCTCAGAGGATGAGG	56	656
140	P2/PCR	GATTTTCCTTATGCAGTGTG	56	279
141	P1/PCR	X ₁ -GACATCTGTAGCACCTTATT	56	410
142	PO	GACTATTCAGTGTATGGAGC	56	348
143	PO	CAACTGAYCTMYACTGTTATGA	A (16 31 35)	
144	MB	X ₂ -brazo ₁ -CAACTGAYCTMYACTGTTATGA-brazo ₂ - X ₃	A (16 31 35)	
145	PO	GAAMCAACTGACCTAYWCTGCTAT	A (33 52 58)	

ES 2 282 599 T3

SEC ID	Tipo de cebador/sonda	Secuencia	Tipo de HPV	nt
146	MB	X ₂ -brazo ₁ -GAAMCAACTGACCTAYWCTGCTAT-brazo ₂ -X ₃	A (33 52 58)	
147	PO	AAGACATTATTCAGACTC	C (18 45 39)	
148	MB	X ₂ -brazo ₁ -AAGACATTATTCAGACTC-brazo ₂ -X ₃	C (18 45 39)	

TABLA 2

Secuencias específicas de L1 para ser incluidas en los cebadores y sondas de NASBA/PCR

SEC ID	Tipo de cebador/sonda	Secuencia
149	P2/PCR	AATGGCATTGTGTTGGGGTAA
150	P1/PCR	X ₁ -TCATATTCCTCCCCATGTC
151	PO	TTGTTACTGTTGTTGATACTAC
152	P2/PCR	AATGGCATTGTGTTGGSRHAA
153	P1/PCR	X ₁ -TCATATTCCTCMMCATGDC
154	PO	TTGTTACTGTTGTTGATACAC
155	PO	TTGTTACTGTTGTTGATACAC
156	P2/PCR	AATGGCATTGTGTTGGSIIAA
157	P2/PCR	AATGGCATTGTGTTGGIIHAA
158	P2/PCR	AATGGCATTGTGTTGGIRIAA
159	P2/PCR	AATGGCATTGTGTTGGGGTAA
160	P2/PCR	AATGGCATTGTGTTGGGGAAA
161	P2/PCR	AATGGCATTGTGTTGGCATAA
162	P2/PCR	AATGGCATTGTGTTGGGGCAA
163	P2/PCR	AATGGCATTGTGTTGGCACAA
164	P1/PCR	X ₁ -TCATATTCCTCMICATGIC
165	P1/PCR	X ₁ -TCATATTCCTCAACATGIC
166	P1/PCR	X ₁ -TCATATTCCTCIICATGTC
167	P1/PCR	X ₁ -TCATATTCCTCIICATGGC
168	P1/PCR	X ₁ -TCATATTCCTCIICATGAC 3'
169	P1/PCR	X ₁ -TCATATTCCTCIICATGCC 3'

ES 2 282 599 T3

Los cebadores preferidos adecuados para ser utilizados en la detección del ARNm de L1 y E6 del HPV mediante NASBA están enumerados en las tablas siguientes. Sin embargo, éstos son meramente ilustrativos y no se desea que el ámbito de la invención deba estar limitado a estas moléculas específicas.

- 5 En las tablas siguientes, los cebadores P2 del NASBA (p2) incluyen la secuencia GATGCAAGGTCGCATATGAG en el extremo 5'; los cebadores P1 del NASBA (p1) incluyen la secuencia AATTCTAATACGACTCACTATAGGGA GAAGG en el extremo 5'. Los oligonucleótidos adecuados para ser utilizados como sondas están identificados por "po". Los cebadores P2 contienen generalmente secuencias del HPV procedentes de la hebra positiva, mientras que los
10 cebadores p1 contienen generalmente secuencias del HPV procedentes de la hebra negativa. nt se refiere a la posición de los nucleótidos en la secuencia genómica del HPV relevante.

TABLA 3

Cebadores y sondas preferidos para el NASBA de E6

Nombre del cebador	Secuencia	Tipo de HPV	nt
HAe6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTA	16	116
HAe6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGACGGTTTGTGTATTGCTGTT C	16	368
HAe6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGCCACAGGAGCGACCCAGAAA	16	116
HAe6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGGTTTGTGTATTGCTGTTC	16	368
HPV16p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGATTCCCATCTCTATATACTA	16	258
HAe6702Ap1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCACGTCGAGTAACTGT	16	208
HAe6702Bp1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTTGCTTGCTGAGTACACACA	16	191
HAe6702Cp1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCAGTACACACATTCTA	16	186
HAe6702Dp1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGCAGTACACACATTCTAA	16	185
H16e6702Ap2	GATGCAAGGTCGCATATGAGACAGTTATGCACAGAGCT	16	142
H16e6702Bp2	GATGCAAGGTCGCATATGAGATATTAGAATGTGTGTAC	16	182
H16e6702Cp2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTTAGAATGTGTGTACTGC	16	185
H16e6702Dp2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGAATGTGTGTACTGCAAG	16	188

ES 2 282 599 T3

Nombre del cebador	Secuencia	Tipo de HPV	nt
H16e6702Apo	ACAGTTATGCACAGAGCT	16	142
H16e6702Bpo	ATATTAGAATGTGTGTAC	16	182
H16e6702Cpo	TTAGAATGTGTGTACTGC	16	185
H16e6702Dpo	GAATGTGTGTACTGCAAG	16	188
HAe6701po	CTTTGCTTTTCGGGATTTATGC	16	235
HAe6702po	TATGACTTTGCTTTTCGGGA	16	230
HAe6701mb1	X ₂ -cgcacgtTATGACTTTGCTTTTCGGGAcatgcg-X ₃	16	230
HAe6701mb2	X ₂ -ccagctTATGACTTTGCTTTTCGGGAagctgg-X ₃	16	230
HAe6701mb3	X ₂ -cacgcTATGACTTTGCTTTTCGGGAagctg-X ₃	16	230
HAe6701mb4	X ₂ -cgatcgTATGACTTTGCTTTTCGGGAacgatcg-X ₃	16	230
HAe6703p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGCAGAGGAGGAGGATGAAATAGTA	16	656
HAe6703p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGCACAAACCGAAGCGTAGAGTC ACAC	16	741
HAe6703po	TGGACAAGCAGAACCGGACAGAGC	16	687
HAe6704p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGCAGAGGAGGAGGATGAAATAGA	16	656
HAe6704p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGCACAAACCGAAGCGTAGAGTC A	16	741
HAe6704po	AGCAGAACCGGACAGACCCCATTA	16	693
H18e6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGACGATGAAATAGATGGAGTT	18	702
H18e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCACGGACACACAAAGGACAG	18	869
H18e6701po	AGCCGAACCAACGTCACA	18	748
H18e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGAAAACGATGAAATAGATGGAG	18	698
H18e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGACACCACGGACACACAAAGGA CAG	18	869
H18e6702po	GAACCACAACGTCACACAATG	18	752
H18e6702mb1	X ₂ -cgcacgtGAACCACAACGTCACACAATGcatgcg-X ₃	18	752
H18e6702mb2	X ₂ -ccgtcgGAACCACAACGTCACACAATGcgacgg-X ₃	18	752
H18e6702mb3	X ₂ -cggaccGAACCACAACGTCACACAATGggtccg-X ₃	18	752
H18e6702mb4	X ₂ -cgatcgGAACCACAACGTCACACAATGcgatcg-X ₃	18	752
H18e6703p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTTCCGGTTGACCTTCTATGT	18	651
H18e6703p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGTCGTCTGCTGAGCTTTCT	18	817
H18e6704p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGCAAGACATAGAAATAACCTG	18	179

ES 2 282 599 T3

Nombre del cebador	Secuencia	Tipo de HPV	nt
H18e6704p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGACCCAGTGTAGTTAGTT	18	379
H18e6704po	TGCAAGACAGTATTGGAAC	18	207
H31e6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGGAAATACCCACGATGAAC	31	164
H31e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGGACACAACGGTCTTTGACA	31	423
H31e6701po	ATAGGGACGACACACCACACGGAG	31	268
H31e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGGAAATACCCACGATGAACTA	31	164
H31e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTGGACACAACGGTCTTTGAC A	31	423
H31e6702po	TAGGGACGACACACCACACGGA	31	269
H31e6703p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGACTGACCTCCACTGTTATGA	31	617
H31e6703p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTATCTACTTGTGTGCTCTGT	31	766
H31e6703po	GACAAGCAGAACCGGACACATC	31	687
H31e6704p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTGACCTCCACTGTTATGAGCAATT	31	619
H31e6704p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTGCGAATATCTACTTGTGTGC TCT GT	31	766
H31e6704po	GGACAAGCAGAACCGGACACATCCAA	31	686
H31e6704mb1	X ₂ -ccgaaggGGACAAGCAGAACCGGACACATCCAAccttcgg-X ₃	31	686
H31e6704mb2	X ₂ -ccgtcggGACAAGCAGAACCGGACACATCCAAcgacgg-X ₃	31	686
H31e6704mb3	X ₂ -cacgtcggGACAAGCAGAACCGGACACATCCAAcgacgtg-X ₃	31	686
H31e6704mb4	X ₂ -cgcagcGGACAAGCAGAACCGGACACATCCAAgctgcg-X ₃	31	686
H31e6704mb5	X ₂ -cgatcggGACAAGCAGAACCGGACACATCCAAcgatcg-X ₃	31	686
H31e6705p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGACTGACCTCCACTGTTAT	31	617
H31e6705p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCACGATTCCAAATGAGCCCCA T	31	809
H33e6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTATCCTGAACCAACTGACCTAT	33	618
H33e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTTGACACATAAACGAACTG	33	763
H33e6701po	CAGATGGACAAGCACAACC	33	694
H33e6703p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTCCTGAACCAACTGACCTAT	33	620
H33e6703p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCATAAGTAGTTGCTGTAT	33	807
H33e6703po	GGACAAGCACAACCAGCCACAGC	33	699
H33e6703mb1	X ₂ -ccaagcGGACAAGCACAACCAGCCACAGCgcttgg-X ₃	33	699
H33e6703mb2	X ₂ -ccaagcgGGACAAGCACAACCAGCCACAGCcgttgg-X ₃	33	699

ES 2 282 599 T3

Nombre del cebador	Secuencia	Tipo de HPV	nt
H33e6703mb3	X ₂ -cccagcGGACAAGCACAAACCAGCCACAGCgctggg-X ₃	33	699
H33e6703mb4	X ₂ -ccaaagcGGACAAGCACAAACCAGCCACAGCgcttttg-X ₃	33	699
H33e6703mb5	X ₂ -cctgcGGACAAGCACAAACCAGCCACAGCgcagg-X ₃	33	699
H33e6703mb6	X ₂ -cgatcgGGACAAGCACAAACCAGCCACAGCcgatcg-X ₃	33	699
H33e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGACCTTTGTGTCCTCAAGAA	33	431
H33e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGAGGTCAGTTGGTTCAGGATA	33	618
H33e6702po	AGAAACTGCACTGTGACGTGT	33	543
H35e6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGATTACAGCGGAGTGAGGTAT	35	217
H35e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGTCTTTGCTTTTCAACTGGA	35	442
H35e5601po	ATAGAGAAGGCCAGCCATAT	35	270
H35e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTCAGAGGAGGAGGAAGATACTA	35	655
H35e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGATTATGCTCTCTGTGAACA	35	844
H35e6703p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGCCCCGAGGCAACTGACCTATA	35	610
H35e6703p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGTCAATGTGTGTGCTCTGTA	35	770
H35e6702po	GACAAGCAAAACCAGACACCTCCAA	35	692
H35e6703po	GACAAGCAAAACCAGACACC	35	692
H52e6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTTGTGTGAGGTGCTGGAAGAAT	52	144
H52e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCCTCTCTTAATGTTT	52	358
H52e6701po	GTGCCTACGCTTTTTTATCTA	52	296
H52e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGTGCCTACGCTTTTTTATCTA	52	296
H52e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGGGTCTCCAACACTCTGAAC A	52	507
H52e6702po	TGCAACAAGCGATTTC	52	461
H58e6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTCAGGCGTTGGAGACATC	58	157
H58e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGAGCAATCGTAAGCACACT	58	301
H58e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTCTGTGCATGAAATCGAA	58	173
H58e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGAGCACACTTTACATACTG	58	291
H58e6701po	TGAAATGCGTTGAATGCA	58	192
H58e6702po	TTGCAGCGATCTGAGGTATATG	58	218
HBe6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTACACTGCTGGACAACAT	B (11)	514
HBe6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCATCTTCTGAGCTGTCT	B (11)	619
HBe6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTACACTGCTGGACAACATGCA	B (11)	514

ES 2 282 599 T3

Nombre del cebador	Secuencia	Tipo de HPV	nt
HBe6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGTCACATCCACAGCAACAGGT CA	B (11)	693
HBe6701po	GTAGGGTTACATTGCTATGA	B (11)	590
HBe6702po	GTAGGGTTACATTGCTATGAGC	B (11)	590
HBe6703p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTGACCTGTTGCTGTGGATGTGA	B (11)	693
HBe6703p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTACCTGAATCGTCCGCCAT	B (11)	832
HBe6703po	ATWGTGTGTCCCATCTGC	B (11)	794
HCe6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGCATGCCATAAATGTATAGA	C (18 39 45)	295
HCe6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCACCGCAGGCACCTTATTAA	C (18 39 45)	408
HCe6701po	AGAATTAGAGAATTAAGA	C (18 39 45)	324
H39e6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGCAGACGACCACTACAGCAA	39	210
H39e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGACACCGAGTCCGAGTAATA	39	344
H39e6701po	ATAGGGACGGGGAACCACT	39	273
H39e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTATTACTCGGACTCGGTGT	39	344
H39e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTTGGGTTTCTCTTCGTGTTA	39	558
H39e6702po	GGACCACAAAACGGGAGGAC	39	531
H39e6703p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGAAATAGATGAACCCGACCA	39	703
H39e6703p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGCACACCACGGACACACAAA	39	886
H39e6703po	TAGCCAGACGGGATGAACCACAGC	39	749
HPV45p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGAACCATTGAACCCAGCAGAAA	45	430
HPV45p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCTTTCTTGCCGTGCCTGGTC A	45	527
HPV45po	GTACCGAGGGCAGTGTAAATA	45	500
H45e6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGAACCATTGAACCCAGCAGAAA	45	430
H45e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCTTTCTTGCCGTGCCTGGTC A	45	527
H45e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGAAACCATTGAACCCAGCAGAAAA	45	428
H45e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTTGCTATACTTGTGTTTCCCT ACG	45	558

ES 2 282 599 T3

Nombre del cebador	Secuencia	Tipo de HPV	nt
H45e6701po	GTACCGAGGGCAGTGTAAATA	45	500
H45e6702po	GGACAAACGAAGATTTCACA	45	467
H45e6703p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGTTGACCTGTTGTGTACCAGCAAT	45	656
H45e6703p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCACCACGGACACACAAAGGAC AAG	45	868
H45e6704p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGCTGTTGACCTGTTGTGTACGA	45	654
H45e6704p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCACGGACACACAAAGGACAA G	45	868
H45e6705p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGTTGACCTGTTGTGTACGA	45	656
H45e6705p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGACGGACACACAAAGGACAAG	45	868
H45e6703po	GAGTCAGAGGAGGAAAACGATG	45	686
H45e6704po	AGGAAAACGATGAAGCAGATGGAGT	45	696
H45e6705po	ACAACTACCAGCCCCGAGCCGAA	45	730
H51e6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGGAGGAGGATGAAGTAGATA	51	658
H51e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGCCATTAACTCTGCTGTA	51	807
H51e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGAGAGGAGGAGGATGAAGTAGATA	51	655
H51e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGACGGGCAAACCAGGCTTAGT	51	829
H51e6701po	GCAGGTGTTCAAGTGTAGTA	51	747
H51e6702po	TGGCAGTGGAAGCAGTGGAGACA	51	771
H56e6701p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTTGGGGTGCTGGAGACAAACATCT	56	519
H56e6701p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTTTCATCCTCATCCTCATCCTC TGA	56	665
H56e6702p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTTGGGGTGCTGGAGACAAACATC	56	520
H56e6702p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCATCCTCATCCTCATCCTCTG A	56	665
H56e6703p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGTTGGGGTGCTGGAGACAAACAT	56	519
H56e6703p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCACAACTTACACTCACAAC A	56	764
H56e6701po	AAAGTACCAACGCTGCAAGACGT	56	581
H56e6702po	AGAACTAACACCTCAAACAGAAAT	56	610
H56e6703po	AGTACCAACGCTGCAAGACGTT	56	583
H56e6703po1	TTGGACAGCTCAGAGGATGAGG	56	656

ES 2 282 599 T3

	Nombre del cebador	Secuencia	Tipo de HPV	nt
5	H56e6704p2	GATGCAAGGTCGCATATGAGGATTTTCCTTATGCAGTGTG	56	279
	H56e6704p1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGACATCTGTAGCACCTTATT	56	410
10	H56e6704po	GACTATTCACTGTATGGAGC	56	348
	HPVAPO1A	CAACTGAYCTMYACTGTTATGA	A (16 31 35)	
15	HPVApo1Amb1	X ₂ -cgcatgCAACTGAYCTMYACTGTTATGAcatgcg-X ₃	A (16 31 35)	
	HPVApo1Amb2	X ₂ -ccgtcgCAACTGAYCTMYACTGTTATGAcgacgg-X ₃	A (16 31 35)	
20				
	HPVApo1Amb3	X ₂ -ccacccCAACTGAYCTMYACTGTTATGAgggtgg-X ₃	A (16 31 35)	
25				
	HPVApo1Amb4	X ₂ -cgatcgCAACTGAYCTMYACTGTTATGAcgatcg-X ₃	A (16 31 35)	
30	HPVAPO4A	GAAMCAACTGACCTAYWCTGCTAT	A (33 52 58)	
	HPVAPO4Amb1	X ₂ -ccaagcGAAMCAACTGACCTAYWCTGCTATgcttgg-X ₃	A (33 52 58)	
35				
	HPVAPO4Amb2	X ₂ -ccaagccGAAMCAACTGACCTAYWCTGCTATggcttgg-X ₃	A (33 52 58)	
40				
	HPVAPO4Amb3	X ₂ -ccaagcgGAAMCAACTGACCTAYWCTGCTATcgcttgg-X ₃	A (33 52 58)	
45				
	HPVAPO4Amb4	X ₂ -ccagcgGAAMCAACTGACCTAYWCTGCTATcgctgg-X ₃	A (33 52 58)	
	HPVAPO4Amb5	X ₂ -cgatcgGAAMCAACTGACCTAYWCTGCTATcgatcg-X ₃	A (33 52 58)	
50				
	HPVCPO4	AAGACATTATTCAGACTC	C (18 45 39)	
55				
	HPVCPO4Amb1	X ₂ -ccaagcAAGACATTATTCAGACTCgcttgg-X ₃	C (18 45 39)	
60				
	HPVCPO4Amb2	X ₂ -cgcatgAAGACATTATTCAGACTCcatgcg-X ₃	C (18 45 39)	
	HPVCPO4Amb3	X ₂ -cccagcAAGACATTATTCAGACTCgctggg-X ₃	C (18 45 39)	
65				

ES 2 282 599 T3

Nombre del cebador	Secuencia	Tipo de HPV	nt
HPVCPO4Amb4	X ₂ -cgatcgAAGACATTATTCAGACTCcgatcg-X ₃	C (18 45 39)	

Los pares de cebadores P1 y P2 que tienen el mismo prefijo (por ejemplo HAe6701p1 y HAe6701p2) están destinados a ser utilizados en combinación. Sin embargo, pueden utilizarse también otras combinaciones, según se resume a continuación, para los tipos de HPV 16, 18, 31, 33 y 45.

Pares de cebadores adecuados para la amplificación del ARNm de E6 del HPV 16 son según sigue:

HAe6701p2 o HAe6702p2 (ambos 116 nt) con HAe6701p1 o HAe6702p1 (ambos 368 nt).

HAe6701p2 o HAe6702p2 (ambos 116 nt) con HPV16p1 (258 nt).

H16e6702Ap2 (142 nt), H16e6702Bp2 (182 nt), H16e6702Cp2 (185 nt) o H16e6702Dp2 (188 nt) con HAe6701p1 o HAe6702p1 (ambos 368 nt).

HAe6701p2 o HAe6702p2 (ambos 116 nt) con HAe6702Ap1 (208 nt), HAe6702Bp1 (191 nt), HAe6702Cp1 (186 nt) o HAe6702Dp1 (185 nt). Estas combinaciones son adecuadas para la amplificación de todas las variantes por ajuste de E6.

HAe6703p2 o HAe6704p2 (ambos 656 nt) con HAe6703p1 o HAe6704p1 (ambos 741 nt). Estas combinaciones son adecuadas para la amplificación de todos los transcritos que contienen la región codificadora de E7 (al menos hasta el nt 741).

Se prefieren los pares de cebadores siguientes para la amplificación del ARNm de E6 del HPV 18:

H18e6701p2 (702 nt) o H18e6702p2 (698 nt) con H18e6701p1 o H18e6702p1 (ambos 869 nt).

H18e6703p2 (651 nt) con H18e6703p1 (817 nt).

H18e6704p2 (179 nt) con H18e6704p1 (379 nt).

Se prefieren los pares de cebadores siguientes para la amplificación del ARNm de E6 del HPV 31:

H31e6701p2 o H31e6702p2 (ambos 164 nt) con H31e6701p1 o H31e6702p1 (ambos 423 nt).

H31e6703p2 (617 nt), H31e6704p2 (619 nt) o H31e6705p2 (617 nt) con H31e6703p1 (766 nt), H31e6704p1 (766 nt) o H31e6705p1 (809 nt).

Se prefieren los pares de cebadores siguientes para la amplificación del ARNm de E6 del HPV 33:

H33e6701p2 (618 nt) o H33e6703p2 (620 nt) con H33e6701p1 (763 nt) o H33e6703p1 (807 nt).

H33e6702p2 (431 nt) con H33e6702p1 (618 nt).

Se prefiere el par de cebadores siguiente para la amplificación de HPV 45:

HPV45p2 (430 nt) con HPV45p1 (527 nt).

ES 2 282 599 T3

TABLA 4

Cebadores para la PCR de E6

Nombre del cebador	Secuencia	Tipo de HPV	nt
HAe6701PCR2	CCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTA	16	116
HAe6701PCR1	ACGGTTTGTGTATTGCTGTTC	16	368
HAe6702PCR2	CCACAGGAGCGACCCAGAAA	16	116
HAe6702PCR1	GGTTTGTGTATTGCTGTTC	16	368
HAe6703PCR2	CAGAGGAGGAGGATGAAATAGTA	16	656
HAe6703PCR1	GCACAACCGAAGCGTAGAGTCACAC	16	741
HAe6704PCR2	CAGAGGAGGAGGATGAAATAGA	16	656
HAe6704PCR1	GCACAACCGAAGCGTAGAGTCA	16	741
H18e6701PCR2	ACGATGAAATAGATGGAGTT	16	702
H18e6701PCR1	CACGGACACACAAAGGACAG	18	869
H18e6702PCR2	GAAAACGATGAAATAGATGGAG	18	698
H18e6702PCR1	ACACCACGGACACACAAAGGACAG	18	869
H18e6703PCR2	TTCCGGTTGACCTTCTATGT	18	651
H18e6703PCR1	GGTCGTCTGCTGAGCTTTCT	18	817
H18e6704PCR2	GCAAGACATAGAAATAACCTG	18	179
H18e6704PCR1	ACCCAGTGTAGTTAGTT	18	379
H31e6701PCR2	GGAAATACCCTACGATGAAC	31	164
H31e6701PCR1	GGACACAACGGTCTTTGACA	31	423

ES 2 282 599 T3

Nombre del cebador	Secuencia	Tipo de HPV	nt
H31e6702PCR2	GGAAATACCCTACGATGAACTA	31	164
H31e6702PCR1	CTGGACACAACGGTCTTTGACA	31	423
H31e6703PCR2	ACTGACCTCCACTGTTATGA	31	617
H31e6703PCR1	TATCTACTTGTGTGCTCTGT	31	766
H31e6704PCR2	TGACCTCCACTGTTATGAGCAATT	31	619
H31e6704PCR1	TGCGAATATCTACTTGTGTGCTCT GT	31	766
H31e6705PCR2	ACTGACCTCCACTGTTAT	31	617
H31e6705PCR1	CACGATTCCAAATGAGCCCAT	31	809
H33e6701PCR2	TATCCTGAACCAACTGACCTAT	33	618
H33e6701PCR1	TTGACACATAAACGAACTG	33	763
H33e6703PCR2	TCCTGAACCAACTGACCTAT	33	620
H33e6703PCR1	CCCATAAGTAGTTGCTGTAT	33	807
H33e6702PCR2	GACCTTTGTGTCTCAAGAA	33	431
H33e6702PCR1	AGGTCAGTTGGTTCAGGATA	33	618
H35e6701PCR2	ATTACAGCGGAGTGAGGTAT	35	217
H35e6701PCR1	GTCTTTGCTTTTCAACTGGA	35	442
H35e6702PCR2	TCAGAGGAGGAGGAAGATACTA	35	655
H35e6702PCR1	GATTATGCTCTCTGTGAACA	35	844
H35e6703PCR2	CCCGAGGCAACTGACCTATA	35	610
H35e6703PCR1	GTCAATGTGTGTGCTCTGTA	35	770
H52e6701PCR2	TTGTGTGAGGTGCTGGAAGAAT	52	144
H52e6701PCR1	CCCTCTCTTCTAATGTTT	52	358
H52e6702PCR2	GTGCCTACGCTTTTTATCTA	52	296
H52e6702PCR1	GGGGTCTCCAACACTCTGAACA	52	507
H58e6701PCR2	TCAGGCGTTGGAGACATC	58	157
H58e6701PCR1	AGCAATCGTAAGCACACT	58	301
H58e6702PCR2	TCTGTGCATGAAATCGAA	58	173
H58e6702PCR1	AGCACACTTTACATACTG	58	291
HBe6701PCR2	TACACTGCTGGACAACAT	B (11)	514
HBe6701PCR1	TCATCTTCTGAGCTGTCT	B (11)	619
HBe6702PCR2	TACACTGCTGGACAACATGCA	B (11)	514
HBe6702PCR1	GTCACATCCACAGCAACAGGTCA	B (11)	693
HBe6703PCR2	TGACCTGTTGCTGTGGATGTGA	B (11)	693

ES 2 282 599 T3

Nombre del cebador	Secuencia	Tipo de HPV	nt
HBe6703PCR1	TACCTGAATCGTCCGCCAT	B (11)	832
HCe6701PCR2	CATGCCATAAATGTATAGA	C (18 39 45)	295
HCe6701PCR1	CACCGCAGGCACCTTATTAA	C (18 39 45)	408
H39e6701PCR2	GCAGACGACCACTACAGCAAA	39	210
H39e6701PCR1	ACACCGAGTCCGAGTAATA	39	344
H39e6702PCR2	TATTACTCGGACTCGGTGT	39	344
H39e6702PCR1	CTTGGGTTTCTCTTCGTGTTA	39	558
H39e6703PCR2	GAAATAGATGAACCCGACCA	39	703
H39e6703PCR1	GCACACCACGGACACACAAA	39	886
H45e6701PCR2	AACCATTGAACCCAGCAGAAA	45	430
H45e6701PCR1	TCTTTCTTGCCGTGCCTGGTCA	45	527
H45e6702PCR2	GAAACCATTGAACCCAGCAGAAAA	45	428
H45e6702PCR1	TTGCTATACTTGTGTTTCCCTACG	45	558
H45e6703PCR2	GTTGACCTGTTGTGTTACCAGCAAT	45	656
H45e6703PCR1	CACCACGGACACACAAAGGACAAG	45	868
H45e6704PCR2	CTGTTGACCTGTTGTGTTACGA	45	654
H45e6704PCR1	CCACGGACACACAAAGGACAAG	45	868
H45e6705PCR2	GTTGACCTGTTGTGTTACGA	45	656
H45e6705PCR1	ACGGACACACAAAGGACAAG	45	868
H51e6701PCR2	GGAGGAGGATGAAGTAGATA	51	658
H51e6701PCR1	GCCCATTAACATCTGCTGTA	51	807
H51e6702PCR2	AGAGGAGGAGGATGAAGTAGATA	51	655
H51e6702PCR1	ACGGGCAAACCAGGCTTAGT	51	829
H56e6701PCR2	TTGGGGTGCTGGAGACAAACATCT	56	519
H56e6701PCR1	TTCATCCTCATCCTCATCCTCTGA	56	665
H56e6702PCR2	TGGGGTGCTGGAGACAAACATC	56	520
H56e6702PCR1	CATCCTCATCCTCATCCTCTGA	56	665
H56e6703PCR2	TTGGGGTGCTGGAGACAAACAT	56	519
H56e6703PCR1	CCACAACTTACACTCACAACA	56	764
H56e6704PCR2	GATTTTCCTTATGCAGTGTG	56	279
H56e6704PCR1	GACATCTGTAGCACCTTATT	56	410

ES 2 282 599 T3

Los pares de cebadores para PCR preferidos para los tipos de HPV 16, 18, 31 y 33 son análogos a los pares de cebadores para el NASBA.

TABLA 5

Cebadores y sondas preferidos para el NASBA de L1

Nombre del cebador	Secuencia
Onc2A2	5' GATGCAAGGTCGCATATGAGAATGGCATTGTGGGGTAA 3'
Onc2A1	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCATATTCCTCCCCATGTC 3'
Onc2PoA	5' TTGTTACTGTTGTTGATACTAC 3'
Onc2B2	5' GATGCAAGGTCGCATATGAGAATGGCATTGTGGSRHAA 3'
Onc2B1	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCATATTCCTCMMCATGDC 3'
Onc2PoB	5' TTGTTACTGTTGTTGATACAC 3'
Onc2PoC	5' TTGTTACTGTTGTTGATACCAC 3'
Onc2C2	5' GATGCAAGGTCGCATATGAGAATGGCATTGTGGSIHAA 3'
Onc2D2	5' GATGCAAGGTCGCATATGAGAATGGCATTGTGGIIHAA 3'
Onc2E2	5' GATGCAAGGTCGCATATGAGAATGGCATTGTGGIRIAA 3'
Onc2F2	5' GATGCAAGGTCGCATATGAGAATGGCATTGTGGGGTAA 3'
Onc2G2	5' GATGCAAGGTCGCATATGAGAATGGCATTGTGGGGAAA 3'
Onc2H2	5' GATGCAAGGTCGCATATGAGAATGGCATTGTGGCATAA 3'
Onc2I2	5' GATGCAAGGTCGCATATGAGAATGGCATTGTGGGGCAA 3'
Onc2J2	5' GATGCAAGGTCGCATATGAGAATGGCATTGTGGCACAA 3'
Onc2K2	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCATATTCCTCMICATGIC 3'
Onc2L2	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCATATTCCTCAACATGIC 3'
Onc2M2	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCATATTCCTCIICATGTC 3'
Onc2N2	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCATATTCCTCIICATGCC 3'
Onc2O2	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCATATTCCTCIICATGAC 3'
Onc2P2	5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCATATTCCTCIICATGCC 3'

TABLA 6

Cebadores preferidos para la PCR de L1

Nombre del cebador	Secuencia
Onc2A1-PCR	5' AATGGCATTGTGTTGGGGTAA 3'
Onc2A2-PCR	5' TCATATTCCTCCCCATGCTC 3'
Onc2B1-PCR	5' AATGGCATTGTGTTGGSRHAA 3'
Onc2B2-PCR	5' TCATATTCCTCMMCATGDC 3'
Onc2C1-PCR	5' AATGGCATTGTGTTGGSIIAA 3'
Onc2D1-PCR	5' AATGGCATTGTGTTGGIIHAA 3'
Onc2E1-PCR	5' AATGGCATTGTGTTGGIRIAA 3'
Onc2F1-PCR	5' AATGGCATTGTGTTGGGGTAA 3'
Onc2G1-PCR	5' AATGGCATTGTGTTGGGGAAA 3'
Onc2H1-PCR	5' AATGGCATTGTGTTGGCATAA 3'
Onc2I1-PCR	5' AATGGCATTGTGTTGGGGCAA 3'
Onc2J1-PCR	5' AATGGCATTGTGTTGGCACAA 3'
Onc2K2-PCR	5' TCATATTCCTCMICATGIC 3'
Onc2L2-PCR	5' TCATATTCCTCAACATGIC 3'
Onc2M2-PCR	5' TCATATTCCTCIICATGTC 3'
Onc2N2-PCR	5' TCATATTCCTCIICATGGC 3'
Onc2O2-PCR	5' TCATATTCCTCIICATGAC 3'
Onc2P2-PCR	5' TCATATTCCTCIICATGCC 3'

Las secuencias específicas del HPV en las SEC ID N^{os}: 149 y 150 (cebadores Onc2A2/Onc2A1-PCR y Onc2A1/Onc2A2-PCR) son idénticas a fragmentos de la secuencia genómica del HPV de tipo 16 desde la posición 6596 a la 6615 (SEC ID N^o: 149; Onc2A2/Onc2A1-PCR) y desde la posición 6729 a la 6747 (SEC ID N^o: 150; Onc2A1/Onc2A2-PCR).

Las secuencias específicas del HPV SEC ID N^{os}: 152 y 153 (Onc2B2/Onc2B1-PCR y Onc2B1/Onc2B2-PCR) son variantes de las secuencias anteriores, respectivamente, que incluyen varias bases degeneradas. Las representaciones de las secuencias de moléculas de oligonucleótidos degenerados proporcionados en la presente utilizan el código estándar IUB para los sitios de bases mixtos: N= G, A, T, C; V= G, A, C; B= G, T, C; H= A, T, C; D= G, A, T; K= G, T; S= G, C; W= A, T; M= A, C; Y= C, T; R= A, G.

Es también posible utilizar variantes de las secuencias específicas del HPV SEC ID N^o: 152 (Onc2B2/Onc2B1-PCR) y SEC ID N^o: 153 (Onc2B1/Onc2B2-PCR) en las que cualquiera de dos de los nucleótidos "SRH" hacia el extremo 3' de la secuencia estén sustituidos por inosina (I), según sigue:

5' AATGGCATTGTGTTGGIIHAA 3'

5' AATGGCATTGTGTTGGSIIAA 3'

5' AATGGCATTGTGTTGGIRIAA 3'

Las secuencias específicas del HPV SEC ID N^{os}: 156-163 (presentes en los cebadores Onc2C2, Onc2D2, Onc2E2, Onc2F2, Onc2G2, Onc2H2, Onc2I2, Onc2J2, Onc2C1-PCR, Onc2D1-PCR, Onc2E1-PCR, Onc2F1-PCR, Onc2G1-PCR, Onc2H1-PCR, Onc2I1-PCR y Onc2J1-PCR) son variantes basadas en la secuencia específica del HPV SEC ID N^o: 152 (Onc2B2/Onc2B1-PCR), mientras que las secuencias específicas del HPV SEC ID N^{os}: 164-169 (presentes en los cebadores Onc2K1, Onc2L1, Onc2M1, Onc2N1, Onc2O1, Onc2P1, Onc2K2-PCR, Onc2L2-PCR, Onc2M2-

PCR, Onc2N2-PCR, Onc2O2-PCR y Onc2P2-PCR) son variantes basadas en la secuencia específica del HPV SEC ID N°: 153 (Onc2B1/Onc2B2-PCR). Estas variantes incluyen bases degeneradas y también residuos de inosina (I). Esta variación de secuencias permite que los oligonucleótidos que incorporan las secuencias variantes se unan a múltiples tipos de HPV. Las bases inosina no interfieren con la hibridación y por tanto pueden ser incluidas en los lugares de variación entre los tipos de HPV con el fin de construir un cebador "consenso" capaz de unirse a múltiples tipos de HPV.

Uno o más de los cebadores Onc2A2, Onc2B2, Onc2C2, Onc2D2, Onc2E2, Onc2F2, Onc2G2, Onc2H2, Onc2I2 y Onc2J2, pueden ser utilizados en combinación con uno o más de los cebadores Onc2A1, Onc2B1, Onc2K1, Onc2L1, Onc2M1, Onc2N1, Onc2O1 y Onc2P1, para la amplificación mediante NASBA del ARNm de L1 del HPV.

Uno o más de los cebadores Onc2A1-PCR, Onc2B1-PCR, Onc2C1-PCR, Onc2D1-PCR, Onc2E1-PCR, Onc2F1-PCR, Onc2G1-PCR, Onc2H1-PCR, Onc2I1-PCR y Onc2J1-PCR, pueden ser utilizados en combinación con uno o más de los cebadores Onc2A2-PCR, Onc2B2-PCR, Onc2K2-PCR, Onc2L2-PCR, Onc2M2-PCR, Onc2N2-PCR, Onc2O2-PCR y Onc2P2-PCR para la amplificación mediante PCR del ARNm de L1 del HPV.

La invención será comprendida adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos experimentales y figuras en las cuales:

la Figura 1A muestra los resultados de un ensayo de NASBA en tiempo real de una única reacción utilizando una sonda molecular fluorescente FAM para HPV 16 en una muestra de una paciente, mientras que la Figura 1B muestra un ensayo de NASBA en tiempo real múltiple (simultáneo) utilizando la sonda molecular fluorescente FAM de la Figura 1A y una sonda molecular fluorescente marcada con Rojo Texas para U1A,

la Figura 2A muestra un NASBA en tiempo real de una sola reacción con la sonda molecular fluorescente FAM para HPV 18 en la muestra de una paciente, mientras que la Figura 2B muestra una versión múltiple (simultánea) con una sonda molecular fluorescente marcada con Rojo Texas para HPV 18 y una sonda molecular fluorescente marcada con FAM para HPV 33,

la Figura 3A muestra un NASBA en tiempo real de una sola reacción con una sonda molecular fluorescente marcada con FAM para HPV 31, mientras que la Figura 3B muestra la versión múltiple (simultánea) incluyendo una sonda molecular fluorescente marcada con Rojo Texas para HPV 45,

la Figura 4A muestra un NASBA en tiempo real de una sola reacción con una sonda molecular fluorescente marcada con FAM para HPV 33, mientras que la Figura 4B es una versión múltiple (simultánea) que incluye una sonda molecular fluorescente para HPV 18 marcada con Rojo Texas,

la Figura 5A muestra un NASBA en tiempo real de una sola reacción con una sonda molecular fluorescente marcada con FAM para HPV 45, mientras que la Figura 5B muestra la versión múltiple (simultánea) que incluye una sonda molecular fluorescente marcada con Rojo Texas para HPV 45 y una sonda molecular fluorescente para HPV 31 marcada con FAM,

la Figura 6 muestra HPV detectado por PreTect HPV-Proofer y PCR en comparación con citología o histología.

Ejemplo 1

Detección de ARNm de HPV mediante la amplificación de ácidos nucleicos basada en NASBA y detección en tiempo real

Recogida y preparación de muestras clínicas

Frotis Pap y muestras de HPV fueron recogidas de 5970 mujeres en el programa de cribado cervical en Oslo, Noruega. Las muestras destinadas a la extracción de ARN/ADN fueron tratadas según sigue:

Se recogieron muestras cervicales de cada una de las mujeres asistentes al programa de cribado cervical utilizando un citocepillo (Rovers Medical Devices, Países Bajos). El citocepillo fue sumergido posteriormente en 9 ml de tampón de lisis (tiocianato de guanidina 5 M). Como el ARN está mejor protegido en el tiocianato de guanidina 5 M a -70°C, se utilizó únicamente 1 ml del volumen total de muestra para cada ciclo de extracción. Las muestras en tampón de lisis fueron almacenadas a -20°C durante no más de una semana, posteriormente a -70°C hasta el aislamiento de ADN/ARN.

El ARN y el ADN fueron aislados automáticamente de 5300 mujeres en el primer ciclo de extracción, utilizando 1 ml de la muestra total de 9 ml en tampón de lisis. El ARN y el ADN fueron extraídos de acuerdo con el método de aislamiento "Boom" de Organon Teknika (Organon Teknika B.V., Boselind 15, P.O. Box 84, 5280 AB Baxtel, Países Bajos; actualmente Biomérieux, 69280 Marcy l'Etoile, Francia) utilizando el extractor Nuclisens™ siguiendo el protocolo para extracción automatizada.

Líneas celulares

ADN y ARN de las líneas celulares HeLa (HPV 18), SiHa (HPV 16) y CaSki (HPV 16) fueron utilizadas como controles positivos para las reacciones de PCR y NASBA. Estas células fueron utilizadas también como material de muestra en el estudio de sensibilidad (Ejemplo 2). Las células SiHa tienen 1-2 copias de HPV 16 integradas por célula, mientras que las células CaSki tienen entre 60-600 copias de HPV 16, integradas y en estado episómico. Las células HeLa tienen 10-50 copias de HPV 18 por célula aproximadamente.

Detección y tipificación del HPV mediante PCR

ADN aislado de raspados cervicales fue sometido a PCR utilizando los cebadores consenso GP5+/6+ (EP-B-0 517 704). La PCR se llevó a cabo en un volumen de reacción de 50 μ l que contenía Tris-HCl 75 mM (pH 8,8 a 25°C), (NH₄)₂ SO₄ 20 mM, Tween 20™ 0,01%, 200 mM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, 1 U de ADN polimerasa Taq recombinante (MBI Fermentas), 3 μ l de muestra de ADN y 50 pmoles de cada uno de los cebadores GP5+ y GP6+. Una etapa de desnaturalización de 2 minutos a 94°C fue seguida por 40 ciclos de amplificación con un procesador de PCR (Primus 96, HPL Block, MWG, Alemania). Cada ciclo incluía una etapa de desnaturalización de 1 minuto, una etapa de hibridación de los cebadores a 40°C durante 2 minutos y una etapa de alargamiento de la cadena a 72°C durante 1,5 minutos. La última etapa de alargamiento fue prolongada en 4 minutos para asegurar una extensión completa del ADN amplificado.

Las muestras positivas con GP5+/6+ fueron sometidas a protocolos de PCR para el HPV de tipo 16, 31 y 33 según sigue:

HPV 16, 31 y 33: La PCR se llevó a cabo en 50 μ l que contenían Tris-HCl 75 mM (pH 8,8 a 25°C), 200 mM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, 2,5 U de ADN polimerasa Taq recombinante (MBI Fermentas), 3 μ l de muestra de ADN y 25 pmoles de cada cebador. Una etapa de desnaturalización de 2 minutos a 94°C fue seguida por 35 ciclos de amplificación con un procesador de PCR (Primus 96, HPL Block, MWG, Alemania). Cada ciclo incluía una etapa de desnaturalización de 30 segundos, una etapa de hibridación de los cebadores a 57°C durante 30 segundos y una etapa de alargamiento de la cadena a 72°C durante 1 minuto. La última etapa de alargamiento fue prolongada en 10 minutos para asegurar una extensión completa del ADN amplificado. El protocolo para HPV 33 tenía una etapa de hibridación de los cebadores a 52°C. Protocolo para el HPV 18: Se diseñaron cebadores para identificar HPV de tipo 18. La PCR se llevó a cabo en 50 μ l que contenían Tris-HCl 75 mM (pH 8,8 a 25°C), (NH₄)₂SO₄ 20 mM, Tween 20 0,01%, 200 mM de cada dNTP, MgCl₂ 2,0 mM, 2,5 U de ADN polimerasa Taq recombinante (MBI Fermentas), 3 μ l de muestra de ADN y 25 pmoles de cada cebador. Una etapa de desnaturalización de 2 minutos a 94°C fue seguida por 35 ciclos de amplificación en un procesador de PCR (Primus 96, HPL Block, MWG, Alemania). Cada ciclo incluía una etapa de desnaturalización de 30 segundos, una etapa de hibridación de los cebadores a 57°C durante 30 segundos y una etapa de alargamiento de la cadena a 72°C durante 1 minuto. La última etapa de alargamiento fue prolongada en 10 minutos para asegurar una extensión completa del ADN amplificado.

Se utilizó un conjunto de cebadores dirigidos contra el gen de la β -globina humana como control de la calidad del ADN (Procedimiento de trabajo, University Hospital Vrije Universiteit, Amsterdam, Países Bajos). La PCR se llevó a cabo en 50 μ l que contenían Tris-HCl 75 mM (pH 8,8 a 25°C), 200 mM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, 1 U de ADN polimerasa Taq recombinante (MBI Fermentas), 3 μ l de muestra de ADN y 25 pmoles de cada cebador. Una etapa de desnaturalización de 2 minutos a 94°C fue seguida por 35 ciclos de amplificación en un procesador de PCR (Primus 96, HPL Block, MWG, Alemania). Cada ciclo incluía una etapa de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, una etapa de hibridación de los cebadores a 55°C durante 1 ½ minutos y una etapa de alargamiento de la cadena a 72°C durante 2 minutos. La última etapa de alargamiento fue prolongada en 4 minutos para asegurar una extensión completa del ADN amplificado. Se utilizó HeLa como control positivo para HPV 18, mientras que se utilizaron SiHa o CaSki como control positivo para HPV 16. Se utilizó agua como control negativo.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 282 599 T3

Cebadores utilizados para la PCR del HPV

Tipo	Cebador	Secuencia de los cebadores	Posición	Longitud (pb)
HPV 16	Pr1	5' TCA AAA GCC ACT GTG TCC TGA 3'	421 - 440	119
	Pr2	5' CGT GTT CTT GAT GAT CTG CAA 3'	521 - 540	
HPV 18	Pr1	(5' TTC CGG TTG ACC TTC TAT GT 3')	651 - 670	186
	Pr2	(5' GGT CGT CTG CTG AGC TTT CT 3')	817 - 836	
HPV 31	Pr1	5' CTA CAG TAA GCA TTG TGC TAT GC 3'	3835 - 3875	153
	Pr2	5' ACG TAA TGG AGA GGT TGC AAT AAC CC 3'	3963 - 3988	
HPV 33	Pr1	5' AAC GCC ATG AGA GGA CAC AAG 3'	567 - 587	211
	Pr2	5' ACA CAT AAA CGA ACT GTG TGT 3'	758 - 778	
Gp+	Gp5+	5' TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC 3'	6624 - 6649	150
	Gp6+	5' GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C	6719 - 6746	
BGPCO3	Pr1	5' ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC		
BGPCO5	Pr2	5' GAA ACC CAA GAG TCT TCT CT		

La visualización de los productos de la PCR se realizó en un chip de ADN 500 (Agilent Technologies, EE.UU.) según su manual. El chip de ADN utiliza electroforesis en gel a microescala con un límite de detección óptimo de 0,5-50 ng/ml. Los resultados fueron interpretados utilizando el programa de ordenador Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, EE.UU.).

La tabla siguiente confirma los cebadores utilizados para la PCR del HPV en muestras de pacientes e indica cebadores de PCR adicionales útiles para HPV 35, 39, 45, 51, 52, 58 y HPV 6/11.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 282 599 T3

Cebadores de PCR para la detección de HPV

Tipo	Cebador	Secuencia de los cebadores	Posición	Longitud (pb)
HPV 6/11	Pr1	5' TAC ACT GCT GGA CAA CAT 3'	514 - 531	123
	Pr2	5' TCA TCT TCT GAG CTG TCT 3'	619 - 636	
HPV 16	Pr1	5' TCA AAA GCC ACT GTG TCC TGA 3'	421 - 441	120
	Pr2	5' CGT GTT CTT GAT GAT CTG CAA 3'	520 - 540	
HPV 18	Pr1	5' TTC CGG TTG ACC TTC TAT GT 3'	651 - 670	186
	Pr2	5' GGT CGT CTG CTG AGC TTT CT 3'	817 - 836	
HPV 31	Pr1	5' CTA CAG TAA GCA TTG TGC TAT GC 3'	3835 - 3857	155
	Pr2	5' ACG TAA TGG AGA GGT TGC AAT AAC CC 3'	3964 - 3989	
HPV 33	Pr1	5' AAC GCC ATG AGA GGA CAC AAG 3'	567 - 587	212
	Pr2	5' ACA CAT AAA CGA ACT GTG GTG 3'	758 - 778	
HPV 35	Pr1	5' CCC GAG GCA ACT GAC CTA TA 3'	610 - 629	231
	Pr2	5' GGG GCA CAC TAT TCC AA ATG 3'	821 - 840	
HPV 39	Pr1	5' GCA GAC GAC CAC TAC AGC AAA 3'	210 - 230	153
	Pr2	5' ACA CCG AGT CCG AGT AAT A 3'	344 - 362	
HPV 45	Pr1	5' GAA ACC ATT GAA CCC AGC AGA AAA 3'	428 - 451	154
	Pr2	5' TTG CTA TAC TTG TGT TTC CCT ACG 3'	558 - 581	
HPV 51	Pr1	5' GGA GGA GGA TGA AGT AGA TA 3'	658 - 677	169
	Pr2	5' GCC CAT TAA CAT CTG CTG TA 3'	807 - 826	
HPV 52	Pr1	5' GTG CCT ACG CTT TTT ATC TA 3'	296 - 315	233
	Pr2	5' GGG GTC TCC AAC ACT CTG AAC A 3'	507 - 528	
HPV 58	Pr1	5' TCA GGC GTT GGA GAC ATC 3'	157 - 174	162
	Pr2	5' AGC AAT CGT AAG CAC ACT 3'	301 - 318	
Gp+	Gp5+	5' TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC 3'		150
	Gp6+	5' GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C		
BGPC03	Pr1	5' ACA CAA CTG TGT TCA CAT GC		
BGPC05	Pr2	5' GAA ACC CAA GAG TCT TCT CT		

Amplificación de ARN mediante NASBA

Precauciones para evitar contaminación:

1. Llevar a cabo la liberación, el aislamiento y la amplificación/detección de los ácidos nucleicos en áreas del laboratorio separadas.

2. Almacenar y preparar los reactivos para la liberación, el aislamiento y la amplificación/detección de los ácidos nucleicos en las áreas del laboratorio en las que vayan a realizarse la liberación, el aislamiento y la amplificación/detección de los ácidos nucleicos, respectivamente.

3. Mantener todos los tubos y viales cerrados cuando no se estén utilizando.

ES 2 282 599 T3

4. Las pipetas y cualquier otro equipamiento que hayan sido utilizados en un área del laboratorio no deben ser utilizados en las demás áreas.

5. Utilizar una pipeta o una punta de pipeta nueva para cada pipeteo.

6. Utilizar pipetas con puntas resistentes a aerosoles para los fluidos que es posible que contengan ácido nucleico. El pipeteo de las soluciones debe ser realizado siempre fuera o dentro de un tubo aislado que se abra y cierre exclusivamente para esta acción. Todos los demás tubos y viales deben mantenerse cerrados y separados del que se está manejando.

7. Utilizar guantes desechables cuando se trabaje con material clínico que es posible que contenga ARN diana o material amplificado. Si es posible, cambiar los guantes después de cada etapa de pipeteo en el procedimiento de ensayo, especialmente después de entrar en contacto con material posiblemente contaminado.

8. Recoger el material desechable utilizado en un recipiente. Cerrar y retirar el recipiente después de cada ensayo.

9. Sumergir las gradillas de los tubos utilizadas durante el aislamiento o la amplificación/detección del ácido nucleico en un detergente (por ejemplo Extran MA01 alcalino de Merck) durante al menos una hora después de cada ensayo.

El procedimiento siguiente se llevó a cabo utilizando los reactivos del kit Nuclisens™ Basic Kit, suministrado por Organon Teknika.

Procedimiento para n=10 muestras:

1. Preparar la solución enzimática

Añadir 55 µl de diluyente enzimático (del Nuclisens™ Basic Kit; contiene sorbitol en solución acuosa) a cada una de tres esferas enzimáticas liofilizadas (del Nuclisens™ Basic Kit; contiene AMV-RT, ARNasa H, ARN polimerasa de T7 y BSA). Dejar esta solución enzimática al menos durante 20 minutos a temperatura ambiente. Juntar las soluciones enzimáticas en un tubo, mezclar bien golpeando el tubo con los dedos, agitar en vórtex brevemente y utilizar en 1 hora. Las concentraciones finales en la mezcla enzimática son sorbitol 375 mM, 2,5 µg de BSA, 0,08 U de ARNasa H, 32 U de ARN polimerasa de T7 y 6,4 U de transcriptasa inversa de AMV.

2. Preparar la solución de esferas reactivas/KCl

Para 10 muestras: añadir 80 µl del diluyente para las esferas reactivas (procedente del Nuclisens™ Basic Kit; contiene Tris/HCl (pH 8,5), 45% de DMSO) a la esfera reactiva liofilizada (procedente del Nuclisens™ Basic Kit; contiene nucleótidos, ditiotritol y MgCl₂) e inmediatamente agitar bien en vórtex. Hacer esto con 3 esferas reactivas y mezclar las soluciones en un tubo.

Añadir 3 µl de agua para NASBA (procedente del Nuclisens™ Basic Kit) a la solución de esferas reactivas reconstituidas y mezclar bien.

Añadir 56 µl de solución madre de KCl (procedente del Nuclisens™ Basic Kit) y mezclar bien. La utilización de esta mezcla KCl/agua tendrá como resultado reacciones de NASBA con una concentración final de KCl de 70 mM. Las concentraciones finales en la solución reactivo/KCl son 1 mM de cada dNTP, 2 mM de ATP, UTP y CTP, GTP 1,5 mM y ITP 0,5 mM, ditiotritol 0,5 mM, KCl 70 mM, MgCl₂ 12 mM, Tris-HCl 40 mM (pH 8,5).

3. Preparar una solución de cebadores/sondas conteniendo cebadores específicos de la diana y una sonda molecular fluorescente

Para cada reacción de la diana transferir 91 µl de la solución de esferas reactivas/KCl (preparada en la etapa 2) a un tubo nuevo. Añadir 25 µl de la solución de cebadores/sonda molecular fluorescente (para dar una concentración final de ~0,1-0,5 µM de cada uno de los cebadores sentido y antisentido y ~15-70 pmoles de la sonda molecular fluorescente por reacción). Mezclar bien en vórtex. No centrifugar.

En el caso de que se vayan a realizar menos de 10 amplificaciones del ARN diana, referirse a la tabla siguiente para obtener las cantidades apropiadas de la solución de esferas reactivas, de la solución de KCl/agua y de los cebadores a utilizar. Las soluciones de los cebadores deben ser utilizadas dentro de los 30 minutos siguientes a su preparación.

Reacciones (n)	Solución de esferas reactivas (µl)	KCl/agua (µl)	Mezcla de cebadores (µl)
10	80	30	10
9	72	27	9
8	64	24	8
7	56	21	7
6	48	18	6
5	40	15	5
4	32	12	4
3	24	9	3
2	16	6	2
1	8	3	1

4. Adición de las muestras

Para cada reacción de ARN diana:

En una placa de microvaloración de 96 pocillos pipetear 10 µl de la solución de cebadores/sonda (preparada en la etapa 3) en cada uno de 10 pocillos. Añadir 5 µl de extracto de ácido nucleico a cada pocillo. Incubar la placa de microvaloración durante 4 minutos a $65 \pm 1^\circ\text{C}$. Enfriar a $41 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 4 minutos. Añadir posteriormente a cada pocillo 5 µl de solución enzimática. Colocar inmediatamente la placa de microvaloración en un instrumento de detección de fluorescencia (por ejemplo NucliSens™ EasyQ Analyzer) y comenzar la amplificación.

Resultados de un estudio clínico

La Tabla 7 muestra la distribución de casos positivos para HPV (expresión de L1 y/o E6) mediante NASBA en tiempo real y de casos positivos para HPV mediante PCR relacionados con los resultados de la citología. La amplificación mediante PCR se llevó a cabo según está descrito por Karlsen y col., J. Clin. Microbiol., 34: 2095-2100, 1996. Los números para la histología esperada están basados en los resultados medios de un estudio similar en lesiones CIN III (Clavel y col., Br. J. Cancer, 84: 1616-1623, 2001). Los resultados de varios casos ejemplares están enumerados en la Tabla 8.

TABLA 7

	Normal	Benigno	Condiloma	CIN III
Citología	4474	66	16	15
PCR	9,0%	44,6%	87,5%	73,3%
NASBA en tiempo real	1%	24,6%	37,5%	73,3%
Histología Esperada	0,2%	5-15%	15-20%	71%

ES 2 282 599 T3

TABLA 8

N° Interno	Citología	PCR	NASBA de L1	NASBA de E6
84	Neg	Neg	Neg	31
289	Neg	31	Pos	31
926	Neg	Neg	Pos	16
743	Benigna	Neg	Neg	33
1512	Benigna	16	Pos	16
3437	Benigna	Neg	Neg	18
3696	Benigna	16	Pos	Neg
2043	Condiloma	16, 51	Pos	16
3873	Condiloma	16, 51	Pos	16
3634	CIN II	33	Neg	33
4276	CIN III	Neg	Neg	18
4767	CIN III	18	Neg	18
1482	CIN III	Neg	Pos	16
5217	CIN III	31	Neg	31
4696	CIN III	Neg	Neg	Neg

Ejemplo 2

Sensibilidad del NASBA en tiempo real en líneas celulares control

Las líneas celulares de cáncer cervical CaSki, SiHa y HeLa fueron diluidas en tampón de lisis antes de la extracción automatizada de ácidos nucleicos utilizando el método de extracción Boom de Organon Teknika/bioMerieux (paralelos 1 y 3), o después de la extracción de los ácidos nucleicos (paralelo 2). El NASBA en tiempo real fue realizado utilizando sondas moleculares fluorescentes ("beacons") marcadas con Rojo Texas (16, L1 y 18) o FAM (U1A, 33 y 31) siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

TABLA 9

	CaSki						CaSki						HeLa					
Conjuntos de cebadores y sondas	16 E6	U1	16 E6	U1	16 E6	U1	L1 E6	33	L1 E6	33	L1 E6	33	18 E6	31 E6	18 E6	31 E6	18 E6	31 E6
Paralelos	1	1	2	2	3	3	1	1	2	2	3	3	1	1	2	2	3	3
Número de Células																		
100.000	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
10.000	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1.000	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
100	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
10	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Por tanto, es posible detectar ARNm de E6 de HPV en menos de 1 célula utilizando NASBA en tiempo real.

El NASBA en tiempo real fue ensayado como un ensayo múltiple simultáneo y como reacciones individuales. Los resultados del siguiente estudio de sensibilidad están basados en procesos simultáneos de las líneas celulares CaSki, SiHa y HeLa, y en tres procesos simultáneos en oligos de ADN sintéticos para HPV de tipo 16, 18, 31 y 33. La definición del límite de detección es que las dos muestras del paralelo sean positivas. El número entre paréntesis (x) indica que la cantidad especificada de células ha sido también detectada en algunos procesos. Se define sensibilidad como la cantidad de células necesaria para la detección de HPV en dos procesos simultáneos. Los tipos de HPV son determinados a partir de la PCR y la especificidad está basada en el NASBA en comparación con la PCR.

Sensibilidad

PCR: La PCR consenso para HPV utilizando Gp5+/6+ detectó únicamente hasta 10^4 células SiHa y HeLa, y hasta 10^3 células CaSki. Sin embargo, los conjuntos de cebadores de PCR específicos de tipo fueron más sensibles, detectando 10^3 (10^2) células SiHa y 0,1 células CaSki para el conjunto de cebadores de PCR específicos de HPV de tipo 16, mientras que el conjunto de cebadores de PCR específicos para HPV de tipo 18 detectó 10^2 células HeLa.

NASBA en tiempo real: El NASBA en tiempo real con cebadores específicos para U1A, detectó 10 (1) células SiHa y CaSki y 1 célula HeLa en la mezcla de reacción. Para los cebadores específicos de HPV 16, el límite de detección inferior fue de 10 (10^2 , 1) células SiHa y 10 (1) células CaSki y para los cebadores específicos de HPV 18 el límite de detección fue de 1 (0,1) célula HeLa. Los cebadores universales de L1 detectaron 10 células CaSki. Las células HeLa y las células SiHa no fueron detectadas con los cebadores universales de L1.

El NASBA múltiple simultáneo en tiempo real con los cebadores específicos de U1A, tuvo un límite de detección inferior de 10^2 (10) células SiHa y 10 (1) células CaSki cuando se combinaron con los cebadores específicos de HPV 16, que tuvieron un límite de detección inferior de 10 (1) células SiHa y 10 (1) células CaSki. Los cebadores específicos de L1 en combinación con los cebadores específicos de HPV 33 detectaron 10^3 (10^2) células CaSki. No había ninguna muestra de HPV 33 competidora en la reacción. Para los cebadores específicos de HPV 18, el límite de detección inferior fue de 1 (0,1) célula HeLa cuando se combinaron con los cebadores específicos de HPV 31. No había ninguna muestra de HPV 31 competidora en la reacción. La sensibilidad de los cebadores específicos de HPV 31 y HPV 33 no fue analizada, debido a la falta de líneas celulares que albergaran estos tipos de HPV. Fueron ensayados frente a muestras que contenían HPV 31 y HPV 33, pero no se conocía la cantidad de células ni el número de copias de HPV 31 y HPV 33 en estas células y muy probablemente variaba en las diferentes muestras.

TABLA 10

Sensibilidad del NASBA en tiempo real en comparación con la PCR

	NASBA			PCR		
Cebador	SiHa	CaSki	HeLa	SiHa	CaSki	HeLa
Gp5/6+	–	–	–	10^4	10^3	10^3
L1	–	10^3 (10^2)	–	–	–	–
U1A	10^2 (10)	10 (1)	–	–	–	–
HPV 16	10 (1)	10	–	10^3 (10^2)	0,1	–
HPV 18	–	–	10 (0,1)	–	–	10^2

El NASBA en tiempo real se llevó a cabo en muestras procedentes de mujeres admitidas en el Østfold Central Hospital para el tratamiento de CIN en el periodo de 1999-2001 (ver el Ejemplo 3). Se utilizaron sondas moleculares fluorescentes marcadas con FAM o Rojo Texas junto con los protocolos de extracción de ácidos nucleicos y de NASBA descritos anteriormente. Los resultados están mostrados en las Figuras 1A y 1B (HPV 16 - muestra de la paciente 205), en las Figuras 2A y 2B (HPV 18 - muestra de la paciente 146), en las Figuras 3A y 3B (HPV 31 - muestra de la paciente 236), en las Figuras 4A y 4B (HPV 33 - muestra de la paciente 218) y en las Figuras 5A y 5B (HPV 45 - muestra de la paciente 343). En cada caso, la Figura "A" es una única reacción mientras que la Figura "B" es el ensayo múltiple simultáneo.

Especificidad: Reactividad cruzada del NASBA en tiempo real

Se ensayaron combinaciones de cebadores de NASBA en tiempo real frente a 490 muestras cervicales procedentes del estudio de Oslo positivas con PCR para HPV 6/11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58 o para HPV X con el fin de comprobar la reactividad cruzada entre los tipos de HPV utilizando NASBA. Todas las muestras habían sido

tipificadas mediante PCR consenso y mediante PCR específica de tipo para los tipos respectivos de HPV, excepto para HPV de tipo 39 (2), 52 (1) y 58 (2). Estas muestras son añadidas para el análisis frente a PreTect HPV-Proofer. HPV X son positivas para la PCR consenso con Gp5+/6+ pero negativas para HPV 6/11, 16, 18, 31, 33, 35, 45 y 51 mediante PCR específica de tipo. Los resultados están mostrados en la Tabla 14. No se demostró reactividad cruzada.

5 La confirmación de la secuencia de un número seleccionado de casos de la Tabla 14 está mostrada en la Tabla 14a.

PCR: Se analizaron un total de 773 muestras cervicales con PCR y con PreTect HPV-Proofer (NASBA múltiple simultáneo en tiempo real), y un total de 24,6% (190/773) muestras fueron positivas con los cebadores de PCR consenso Gp5+/6+. El 74,1% (83/112) fueron tipificadas como HPV 16, el 13% (15/112) HPV 18, el 17% (19/112) HPV 31 y el 12% (13/112) HPV 33 incluyendo infecciones por múltiples HPV. Un total de 103 muestras tenían infecciones por un único HPV o por múltiples HPV, y el 91,3% (94/103) tenían únicamente infección por un sólo HPV. Las infecciones por dos HPV tenían lugar en el 8,7% (9/103) de las muestras. Todas las muestras fueron analizadas primeramente con los cebadores de PCR consenso Gp5+/6+. Las muestras negativas en la PCR para HPV procedentes de la PCR consenso con Gp5+/6+ fueron analizadas posteriormente con los cebadores control de β -globina para la verificación de ADN intacto. Las muestras positivas en la PCR para HPV no fueron sometidas a este control de ADN. Las muestras negativas para HPV en este estudio fueron todas positivas con los cebadores de PCR de β -globina control. Únicamente las muestras de ADN positivas en la PCR con Gp5+/6+ fueron sometidas a una PCR específica de tipo. Los tipos de HPV de interés fueron HPV 16, 18, 31 y 33.

20 NASBA múltiple simultáneo en tiempo real: Para las reacciones de NASBA en tiempo real, se utilizaron los cebadores y sondas para el producto del gen U1A como control de funcionamiento para ARN intacto. Las muestras negativas para U1A fueron rechazadas. Un total de 14,2% (110/773) de las muestras fueron positivas con al menos uno de los cebadores de NASBA específicos para un tipo de HPV incluyendo las muestras que presentaban infecciones por múltiples HPV. De estas muestras, el 54,5% (60/110) fueron positivas con los cebadores de NASBA para HPV 16, el 13,6% (15/110) con los cebadores para HPV 18, el 21,8% (24/110) con los cebadores para HPV 31 y el 13,6% (15/110) con los cebadores para HPV 33. Un total de 45 muestras fueron positivas con los cebadores consenso para L1 y normalmente junto con la expresión de los oncogenes E6/E7 del HPV 16 82,2% (13/45). El L1 consenso fue detectado en el 2,2% (1/45) junto con HPV 18, 31 y 33, respectivamente. L1 fue también detectado solo en el 8,9% (4/45) de los casos, y todos fueron positivos en la PCR con los cebadores Gp5+/6+. Un total de 108 muestras tenían infecciones por un único HPV o por múltiples HPV, y el 98,1% (106/108) tenían únicamente infecciones por un solo HPV. La doble expresión de ARNm tuvo lugar en el 1,9% (2/108) de las muestras.

NASBA múltiple simultáneo en tiempo real comparado con la PCR: Un total de 87 muestras mostró la presencia de ADN o ARN de HPV 16 con PCR para HPV 16 o con PreTect HPV-Proofer. Se determinó que el 64,4% (56/87) eran positivas para HPV 16 con PCR y con NASBA en tiempo real. El 39,1% (34/87) eran sólo positivas con PCR y el 3,4% (3/87) eran sólo positivas con NASBA en tiempo real. Para HPV 18, un total de 20 muestras mostraron la presencia de ADN o ARN de HPV 18 con PCR o con NASBA en tiempo real. De estas 20 muestras, el 50% (10/20) fueron positivas con ambos ensayos y el 35% (7/20) fueron positivas únicamente con PCR y el 15% (3/20) fueron sólo positivas con NASBA en tiempo real. Un total de 27 muestras mostraron la presencia de ADN o ARN de HPV 31 con PCR o NASBA en tiempo real. De estas 27 muestras, el 59,3% (16/27) fueron positivas con ambos ensayos y el 11,1% (3/27) fueron positivas únicamente con el ensayo de PCR y el 18,5% (5/27) fueron únicamente positivas con el ensayo de NASBA en tiempo real. Para HPV 33, un total de 18 muestras mostraron la presencia de ADN o ARN de HPV con PCR o con PreTect HPV-Proofer, y el 55,6% (10/18) de las muestras dieron positivo con ambos ensayos. El 16,7% (13/18) fueron únicamente positivas con PCR y el 22,2% (4/18) fueron únicamente positivas con el NASBA en tiempo real.

TABLA 11

Distribución estadística de HPV en las muestras con PCR y con NASBA en tiempo real

	PCR	%	NASBA	%
Muestras totales	773		773	
Muestras positivas totales	190	24,6	110	14,2
HPV 16	83	74,1	60	54,5
HPV 18	15	13	15	13,6
HPV 31	19	17	24	21,8
HPV 33	13	12	15	13,6
HPV X	78	69,6	–	–

ES 2 282 599 T3

TABLA 12

Correspondencia entre PCR y NASBA en tiempo real

	Total	Ambos Ensayos	%	Sólo PCR+	% (PCR)	% (Total)	Sólo NASBA+	% (NASBA)	% (Total)
HPV 16	87	56	64,4	34	41,0	39,1	3	5	3,4
HPV 18	20	10	50,0	7	46,7	35,0	3	20	15,0
HPV 31	27	16	59,3	3	15,8	11,1	5	20,8	18,5
HPV 33	18	10	55,6	3	23,1	16,7	4	26,7	22,2

TABLA 13

Resultados del NASBA en tiempo real para L1

	Total	%
L1 (NASBA	45	100
L1 + HPV 16	37	82,2
L1 solo	4	8,9
L1 + HPV 18	1	2,2
L1 + HPV 31	1	2,2
L1 + HPV 33	1	2,2

TABLA 14

Especificidad genética del NASBA múltiple simultáneo en tiempo real en comparación con la PCR

NASBA	HPV (PCR)													Número
Cebadores														Total
	6/11	16	18	31	33	35	39	45	51	52	58	X		
16	2	28	1	0	1	1	0	0	5	0	0	2		
18	1	1	18	0	1	0	0	0	1	0	0	1		
31	1	0	1	13	1	5	0	1	1	0	0	0		
33	1	2	0	2	12	2	0	1	2	0	0	1		
45	2	1	1	1	1	1	0	17	1	0	0	1		
Suma analizadas	43	71	36	32	25	23	2	23	31	1	2	201	490	

TABLA 14a

Secuenciación del ADN a partir de los cebadores de PCR Gp5+ (no será incluido en el artículo)

Nº Int	Tipo de HPV por PCR	Tipo de HPV por PreTect HPV-Proofer	Tipo de HPV por secuenciación (BLAST)
1272	16	16	16
152	35		35
2655	58		58
2924	33	33	33
2942	18	18	18
2987	16	16	16
3016	33	33	33
3041	35		35
3393	35		35
3873	16	16	16
4767	18	18	18
5707	18	18	18
845	X		39

Discusión

La sensibilidad del NASBA en tiempo real fue en general mejor que la sensibilidad de la PCR. La sensibilidad general del NASBA en tiempo real para todos los marcadores estaba entre 1 y 10^2 células, la cual es considerablemente mejor que para la reacción de PCR con un rango de sensibilidad de 10^2 a 10^4 . Según se esperaba, la sensibilidad de los cebadores y sondas específicos era mejor que la sensibilidad de los cebadores y sondas universales. El NASBA en tiempo real era tan sensible o más sensible que el NASBA múltiple simultáneo en tiempo real.

Se utilizaron cebadores de NASBA en tiempo real y la sonda molecular fluorescente dirigida hacia U1A (un gen constitutivo humano) como control de funcionamiento del material de muestra en la reacción de NASBA en tiempo real con el fin de asegurar que el ARN del material de la muestra estaba intacto. Una señal positiva procedente de esta reacción era necesaria para la validación de la reacción de NASBA en tiempo real.

La sensibilidad del NASBA en tiempo real universal con L1 (la principal proteína de la cápsida de HPV) era mucho mejor que para la PCR con Gp5+/6+ universal, dirigida también contra L1, con una sensibilidad de 10 células en comparación con 10^3 (10^2) células CaSki. Estos dos conjuntos de cebadores (PCR y NASBA) tenían sus dianas en la misma región del gen L1 conservado de diferentes tipos de HPV. Las diferencias en sensibilidad pueden ser debidas al hecho de que hay normalmente una copia de cada gen por célula, mientras que el número de copias de ARNm puede ser de varios cientos. Los cebadores de L1 del NASBA en tiempo real no detectaron células SiHa ni HeLa como lo hicieron los cebadores de PCR Gp5+/6+, indicando la ausencia de expresión de L1 en estas líneas celulares. Los cebadores de PCR Gp5+/6+ detectaron 10^4 células SiHa o HeLa. Considerando la cantidad de copias de HPV en cada célula, tiene sentido el que se detectaran células CaSki en 1/10 de la cantidad de células SiHa y HeLa, ya que las células CaSki tienen 60-600 copias de HPV por célula, integradas y episómicas, mientras que las células SiHa tienen 1-2 copias de HPV integradas por célula y las células HeLa tienen 10-50 copias de HPV integradas por célula. El conjunto de cebadores para L1 detectó únicamente células CaSki, con las formas integradas y episómicas de HPV, y no células SiHa ni HeLa, únicamente con formas integradas de HPV. Esto podría indicar que el gen L1 es el único expresado en los estados episómicos de la infección por HPV, y por tanto L1 puede ser un marcador valioso de la integración y la persistencia de la infección por HPV.

Los cebadores de NASBA específicos para un tipo de HPV están dirigidos contra el transcrito de E6/E7 de longitud completa, que se expresa en gran cantidad en las células cancerosas debido a la ausencia del producto del gen E2. Los 16 cebadores específicos de tipo del NASBA en tiempo real detectaron 10 (1) células SiHa y 10 (1) células CaSki, en comparación con los cebadores de PCR para HPV 16 que detectaron 10^3 (10^2) células SiHa. La explicación de esto

podría ser la diferente cantidad de copias de HPV en cada línea celular. Las células CaSki tienen formas integradas y formas episómicas de HPV, mientras que SiHa tiene únicamente formas integradas del HPV. Esto puede ser debido a la elevada expresión de ARNm de los genes E6/E7. Para la detección de células CaSki, el límite de detección para los cebadores del NASBA para HPV 16 era de 10 (1) células CaSki en comparación con 0,1 células CaSki para los
 5 cebadores de PCR de HPV 16. Esto es peculiar, pero una explicación puede ser que las células CaSki contienen de 60-600 copias de ADN de HPV 16, por lo que es posible detectar 0,1 células CaSki con 6-60 copias de ADN de HPV 16. La menor sensibilidad del NASBA en tiempo real en comparación con la PCR, puede indicar que la expresión de E6/E7 en las células CaSki es moderada/baja. La degradación del ARNm inestable puede ser también una explicación. La cantidad de copias de HPV en las células CaSki puede ser del orden de 60-600 veces mayor que en las células
 10 SiHa, lo cual está mostrado por la detección más sensible de células CaSki.

Los cebadores de PCR específicos de tipo para HPV 18 detectaron 10^2 células HeLa. Esta es una magnitud 100 veces mejor que la de los cebadores Gp5+/6+ consenso para HPV e indica que los cebadores específicos son en general más sensibles que los cebadores consenso. La sensibilidad de los cebadores de NASBA específicos de tipo para HPV
 15 18 fue de 1 (0,1) células HeLa, indicando una elevada expresión de E6/E7 en las células HeLa.

La sensibilidad de los cebadores de NASBA para U1A fue de 10 células SiHa o CaSki. La diana para el conjunto de cebadores de U1A es un gen constitutivo humano que se expresa en todas las células humanas.

20 La sensibilidad de la PCR y del NASBA varía para los diferentes conjuntos de cebadores y materiales de muestra, y en general los cebadores específicos de tipo son más sensibles que los cebadores consenso debido al desacoplamiento de pares de bases en los conjuntos de cebadores consenso. La temperatura de hibridación para los cebadores en la reacción de PCR puede ser optimizada, dando condiciones de reacción óptimas para los cebadores. En contraste con la temperatura de hibridación en la PCR, la temperatura de hibridación para los cebadores del NASBA debe ser fijada
 25 a 41°C. Esta falta de flexibilidad de la temperatura puede hacer que los cebadores del NASBA sean menos sensibles y menos específicos que los cebadores de PCR.

La PCR amplifica ADN de doble hebra y la diana está normalmente presente como una copia por célula, y esto la hace vulnerable al número de células en el material de muestra. La diana para la reacción de NASBA es ARN, y el
 30 ARNm puede estar presente como múltiples copias por célula, dependiendo de la expresión de los genes. Elijiendo un gen que se exprese mucho, el número de copias de ARNm puede ser de varios cientos por célula y por tanto más fácil de detectar.

El ADN de doble hebra es relativamente estable en la célula y el material permanece intacto durante mucho tiempo.
 35 En contraste con el ADN de doble hebra, el ARNm no es en general muy estable y la degradación del ARNm es rápida, dependiendo de la célula. No se detecta actividad ADNasa o ARNasa en el tampón de lisis, por lo que el ADN de doble hebra y el ARN de hebra sencilla deben ser estables. La actividad autocatalítica puede degradar el ADN y el ARN. El ADN/ARN de la muestra de cérvix debe permanecer intacto cuando se almacena en el tampón de lisis durante 24 horas a 15-30°C, durante 7 días a 2-8°C o a -70°C para un almacenamiento de larga duración.

40 Una limitación de la reacción de NASBA en tiempo real es la concentración de las sondas moleculares fluorescentes ("beacons"). La cantidad de los productos superará a la concentración de las sondas moleculares fluorescentes y por tanto no será detectada debido a que una elevada concentración de las sondas moleculares fluorescente hará que la mezcla de reacción sea más compleja e inhibirá la reacción de amplificación. Los nucleótidos pueden ser también una
 45 limitación para la cantidad final del producto de amplificación, tanto en la reacción de PCR como en la reacción del NASBA. La concentración final del producto amplificado puede inhibir por sí misma la amplificación posterior debido a la cantidad de producto y a la complejidad de la mezcla de reacción. Durante una reacción de NASBA en presencia de sondas moleculares fluorescentes, la sonda podría competir con la amplificación hibridándose al molde, haciendo que el mismo no esté disponible para la síntesis de ARN posterior. De esta forma, el ARN es eliminado como sustrato
 50 para las etapas de transcripción inversa y para la síntesis posterior de ARN mediante la ARN polimerasa de T7. Esta competición no es significativa con pequeñas cantidades de sonda molecular fluorescente, y con una elevada cantidad de sonda molecular fluorescente esta inhibición puede ser superada por un número mayor de copias del ARN inicial.

La relación lineal entre la cantidad de ARN inicial y el tiempo hasta obtener una señal positiva fue analizada
 55 en diluciones seriadas de 10 veces de diferentes líneas celulares con HPV. Existía una clara indicación de que una señal positiva era dependiente de la cantidad de ARN inicial y del tiempo. La reacción múltiple simultánea necesitaba más tiempo que la reacción única para mostrar una señal positiva. Esto podría ser debido a una competición en la mezcla más compleja en el recipiente de la reacción múltiple y también al hecho de que la reacción múltiple tiene una concentración diferente y menor de cebador y sonda. La relación entre la cantidad de ARN diana y el tiempo hasta
 60 obtener una señal positiva revela la posibilidad de una reacción de amplificación cuantitativa múltiple simultánea en tiempo real con estándares internos de ARN en cada recipiente de reacción.

NASBA en tiempo real: individual frente a múltiple. El NASBA en tiempo real era en general más sensible que el NASBA múltiple simultáneo en tiempo real. Esto era según se esperaba debido a la competición entre los cebadores y
 65 sondas en la reacción múltiple simultánea. La concentración final de cebadores y de sondas moleculares fluorescentes fue optimizada en la reacción múltiple de tal manera que para al menos uno de los conjuntos de cebadores y sondas la concentración era menor que en la reacción individual. A partir de esto se deduce que con una concentración menor de cebadores, menos sensible sería la reacción, o al menos menos rápida. Se tardará más tiempo en alcanzar la etapa

exponencial de la reacción de amplificación y por tanto más tiempo en detectar los productos. La concentración de los cebadores no será una limitación para la concentración final del producto en la reacción de NASBA, ya que el ADN de doble hebra creado a partir de los cebadores continuará sirviendo como molde para la ARN polimerasa una y otra vez de nuevo en un bucle. La sensibilidad del NASBA múltiple simultáneo en tiempo real era la misma para HPV 16 y HPV 18 en comparación con el NASBA individual en tiempo real, pero la sensibilidad para L1 disminuyó drásticamente desde un límite de detección de 10 (1) en la reacción individual hasta 10^3 (10^2) células CaSki en la reacción múltiple. Para los cebadores de NASBA para U1A, la sensibilidad disminuyó desde 10 (1) a 10^2 (10) células SiHa, mientras que el límite de detección permanecía igual para las células CaSki. Esta disminución del límite de detección puede ser debida a una competición más compleja de los cebadores y sondas moleculares fluorescentes en la reacción múltiple. La concentración final de cebadores y sondas moleculares fluorescentes puede no ser la mejor y los diferentes cebadores y sondas moleculares fluorescentes en la reacción múltiple pueden interferir entre sí. Los cebadores de NASBA para U1A detectaron 1 célula HeLa. Podría esperarse el mismo nivel de detección en todas las líneas celulares, pero la sensibilidad de las células HeLa era 1/10 del nivel de detección de las células SiHa y CaSki. Estas líneas celulares son células cancerosas y podrían tener diferente impacto en las células de tal manera que la expresión de U1A fuera diferente. Las diferencias pueden ser también debidas a la diferente cantidad de células en cada reacción, debido a errores de conteo durante la recogida de las células.

El NASBA en tiempo real no mostró reactividad cruzada entre HPV 16, 18, 31 y 33 o con HPV 6/11, 35, 39, 45, 51, 52, 58 o HPV X.

La especificidad de la reacción de PCR puede ser mejor que la especificidad de la reacción de NASBA en tiempo real debido a que la reacción de NASBA es una reacción isotérmica a 41°C, sin posibilidad de cambiar la temperatura de hibridación de los cebadores. Los cebadores son diseñados básicamente de la misma forma que los cebadores de PCR. En una reacción de PCR se tiene la posibilidad de cambiar la temperatura de hibridación, en contraste con la reacción de NASBA, y por tanto elegir una temperatura de hibridación que sea óptima para los dos cebadores. Esto hace que la hibridación de los cebadores sea más específica. Los resultados de la PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel. Pero las sondas moleculares fluorescentes en la reacción de NASBA en tiempo real son un parámetro adicional en comparación con la PCR, y por tanto pueden conferir a la reacción de NASBA total una mejor especificidad. Es también más fácil encontrar dos regiones diferentes en la secuencia del ADN para la hibridación de los cebadores, ya que existe una flexibilidad en la longitud del producto de la PCR mucho mayor que para el producto del NASBA, que debe ser menor de 250 pb. Para la especificidad de la reacción del NASBA es importante elegir un área única que no esté conservada entre los diferentes tipos de HPV. Un par de desacoplamientos de pares de bases puede dar todavía una amplificación o hibridación de la diana.

La detección de células CaSki (con estado integrado y episómico) con los cebadores de NASBA para L1 universales y no de células SiHa o Hela (ambas con el estado integrado) puede dar una indicación de que el HPV integrado no presenta expresión de L1, mientras que el HPV en estado episómico puede tener expresión de L1.

En resumen, se ha desarrollado un ensayo de identificación para HPV de tipo 16, 18, 31 y 33 que puede identificar de manera precisa la expresión de los oncogenes E6/E7 de estos tipos de HPV. El ensayo puede identificar también la expresión de la proteína principal de la cápsida, L1.

Ejemplo 3

Estudio clínico adicional en 190 pacientes

Pacientes/muestras clínicas

Biopsias procedentes de 190 mujeres admitidas en el Hospital Central de Østfold para tratamiento de CIN en el periodo de 1999-2001. La edad media de las 190 mujeres incluidas en el estudio fue de 37,4 años (rango 22-74 años). Las biopsias fueron congeladas a -80°C inmediatamente después de su recogida.

Examen citológico de las muestras

Se utilizaron los informes citológicos de rutina para registrar los hallazgos citológicos. No se intentó volver a evaluar los portos. Cada uno de ellos indicaba una condición CIN II-III, esto es una displasia de grado elevado o HSIL, que era la base para la admisión en el hospital, la colposcopia y la biopsia.

Examen histológico de las muestras

Se tomó una biopsia, denominada en la presente *biopsia 1*, después de un informe citológico de alto grado. Si confirmaba una lesión de alto grado (CIN II o III), la paciente era admitida de nuevo en el hospital, esta vez para una conización guiada colposcópica. Antes de la conización, pero después de aplicar anestesia local, se tomó una segunda biopsia (*biopsia 2*) de un área de una porción en la que era muy probable que se localizara una displasia, según se estimó a partir de los hallazgos macroscópicos. Esta biopsia (2 x 2 mm) fue congelada dentro de los 2 minutos siguientes en un congelador de -80°C.

La *biopsia 2* fue dividida en dos cuando fue congelada y la mitad se utilizó para la extracción de ADN/ARN. La otra mitad fue fijada en formaldehído tamponado al 10% y procesada para el examen histopatológico. Algunas lesiones no estaban orientadas correctamente en el bloque de parafina y tuvieron que ser reorientadas o seccionadas serialmente para mostrar el epitelio superficial relevante. En consecuencia, no pudo garantizarse que se hubiera utilizado exactamente el mismo tejido para la extracción y para la evaluación histopatológica. El espécimen cónico, finalmente, fue evaluado por el patólogo local que en todos los casos pudo confirmar la presencia de displasia. No era siempre el mismo grado que en la biopsia original y, en muchos casos, no era el mismo que en la *biopsia 2*.

Extracción de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos fueron aislados utilizando el Nuclisens Extractor automatizado según se describió previamente (Boom y col., 1990). Cada biopsia fue cortada en dos fragmentos, uno destinado al examen histológico y la otra mitad para el análisis de ARN. El material destinado al análisis de ARN fue dividido en fragmentos más pequeños mientras se mantenía en nieve carbónica (-80°C) y se puso en 1 ml de tampón de lisis (igual que anteriormente) seguido por 20 segundos de homogenización utilizando trituradores desechables. Cien mililitros de la muestra fueron diluidos posteriormente 10 veces en tampón de lisis y luego 100 ml fueron extraídos para determinar ADN/ARN. El ADN/ARN extraído fue diluido con ~40 ml de tampón de elución (Organon Teknika) y almacenado a -70°C.

Todas las sondas moleculares fluorescentes ("beacons") utilizadas en este estudio emplean el fluoróforo FAM (6-carboxifluoresceína) en el extremo 5' de la estructura. Éste fue unido a una secuencia variable del bucle troncal acoplada al amortiguador universal ácido 4-(4'-diametilaminofenilazo)benzoico (DABCYL) en el extremo 3'. Las sondas fueron suministradas por Eurogentec, Bélgica. La concentración final de sondas moleculares fluorescentes utilizada en la reacción fue de 2,5 mM. Para el NASBA en tiempo real utilizamos el kit Nuclisens Basic Kit (Organon Teknika, Países Bajos), destinado al desarrollo de ensayos de amplificación de ARN definidos por el usuario. La amplificación mediante NASBA se llevó a cabo en un volumen de 20 µl. Los conjuntos de cebadores y las sondas estaban dirigidos contra el ARNm de E6/E7 de longitud completa de los HPV de alto riesgo 16, 18, 31 y 33. Como control de funcionamiento, para evitar resultados negativos falsos debido a la degradación del ácido nucleico, utilizamos un conjunto de cebadores y una sonda dirigidos contra la proteína A específica de la ribonucleoproteína nuclear pequeña (snRNP) U1 humana (ARNm de U1A) (Nelissen y col., 1991). Todas las muestras fueron procesadas por duplicado en máquinas separadas (lectores de microplacas para medir la fluorescencia y la absorbancia, Bio-tek FL-600 FA de MWG). El ARNm aislado de células CaSki/SiHa o HeLa sirvió como control positivo para los transcritos de HPV 16 y HPV 18, respectivamente. Los controles negativos, incluidos para cada reacción, consistían en una reacción que contenía todos los reactivos excepto ARNm.

Análisis del ADN del HPV; Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se utilizaron para la PCR los mismos extractos y las mismas cantidades que las utilizadas en la reacción de NASBA. Se utilizaron los cebadores Gp5+/Gp6+ consenso para L1 con el fin de detectar todas las muestras que contenían ADN de HPV. La amplificación por PCR se llevó a cabo según se describió anteriormente. La primera desnaturalización del ADN se realizó durante 2 minutos a 94°C, posteriormente se realizaron 40 ciclos de PCR: desnaturalización durante 1 minuto a 94°C, hibridación durante 2 minutos a 40°C, extensión durante 1,5 minutos a 72°C, seguido por una extensión final durante 4 minutos a 72°C. La tipificación del HPV se realizó utilizando cebadores de PCR específicos de tipo frente a HPV 16, 18, 31 y 33 (6/11, 35, 45, 51, 52, 58), según se describió anteriormente.

Resultados

Originalmente se sometieron a biopsia 190 pacientes después de haber sido diagnosticadas de CIN I, CIN II o CIN III mediante citología. Una lesión de alto grado fue confirmada por examen histológico, 150 muestras diagnosticadas como CIN III (78,9%). La *biopsia 2*, tomada antes de la conización, fue utilizada para el análisis de ARN. Sin embargo, el examen histológico de esta biopsia diagnosticó solamente 53 muestras de las 150 originales como CIN III [a 54 no se les dio ningún diagnóstico, 24 fueron diagnosticadas como CIN II, 18 como CIN I y 4 como HPV/condiloma]. El número de muestras con CIN II aumentó de 16 (8,4%) a 30 (15,8%) [por la Histología I, 24 fueron diagnosticadas como CIN III, 4 como CIN II, 1 como carcinoma y 1 como CIN I. A 12 casos de CIN II de la Histología I se les dio un diagnóstico inferior en la Histología II]. El grado de CIN I aumentó de 6 muestras (3,2%) a 32 muestras (16,8%). Los 2 carcinomas de células escamosas fueron diagnosticados en la Histología II como CIN III, el adenocarcinoma como CIN II. En 71 muestras (38,4%), no se detectaron lesiones de grado alto.

ARN oncogénico de HPV fue detectado en 69 (36%) de las 190 pacientes. De las 53 muestras (28%) diagnosticadas como CIN III en la Histología II, encontramos 40 casos (76%) que presentaban la expresión oncogénica de HPV 16, 18, 31 ó 33. Además, encontramos expresión oncogénica en 9 de 30 casos (30%) de CIN II, en 4 de 32 casos (13%) de CIN I, en 14 de 71 casos (20%) que no presentaban anomalías celulares y en 2 de 4 muestras (50%) diagnosticadas como HPV/condiloma.

Se encontró ARN de HPV 16 en 42 de las 190 pacientes, se encontró HPV 18 en 7 (3,7%), HPV 31 en 15 (7,9%) y HPV 33 en 8 (4,2%). Una paciente tenía una infección mixta con HPV 16 y HPV 18, y una con HPV 16 y HPV 31.

ES 2 282 599 T3

Utilizando los cebadores consenso Gp5+/Gp6+ dirigidos contra el gen L1, que codifica la proteína principal de la cápsida, la PCR detectó HPV en 81 de las 190 biopsias cervicales (43%). De los 119 casos a los que se dio un diagnóstico en el segundo examen histológico (115 diagnosticados como CIN, 4 como HPV/condiloma), se encontraron 63 que contenían ADN de HPV. A los 18 casos adicionales detectados no se les dio ningún diagnóstico histológico. De los 81 casos, 20 no fueron detectados por NASBA; a 7 de éstos se les dio el diagnóstico de CIN III, 2 fueron diagnosticados como CIN II, 4 diagnosticados como CIN I y a 7 no se les dio ningún diagnóstico.

La PCR específica de tipo detectó 85 casos que contenían HPV; 66 que tenían HPV 16, 10 HPV 18, 14 HPV 31 y 7 HPV 33. Doce casos tenían infección múltiple: 3 con HPV 16+18, 4 con HPV 16+33, 5 con HPV 16+31. Hubo 20 sin diagnóstico.

Ejemplo 4

HPV detectado por PreTect HPV-Proofer y PCR en comparación con la citología y la Histología

Se determinaron por citología muestras normales y con ASCUS (incluyendo frotis dudosos). Todas las muestras fueron analizadas con PCR consenso y PreTect HPV-Proofer, pero únicamente las muestras positivas para el consenso fueron tipificadas por PCR. Las muestras con CIN III y cáncer fueron determinadas por histología y todas las muestras fueron analizadas con los tres métodos. Los resultados están mostrados en la Figura 6. La concordancia entre el NASBA múltiple simultáneo en tiempo real y la PCR en comparación con la citología o la histología está mostrada en la Tabla 15 siguiente.

TABLA 15

Concordancia entre el NASBA múltiple en tiempo real y la PCR en comparación con la citología o la histología

Citología/Histología	Concordancia ^a (Número)	Concordancia ^b (Número)
Normal	98,2% (4043)	42,8% (138)
ASCUS^c	94,5% (55)	78,6% (14)
CIN III	94,3% (53)	93,2% (44)
Cáncer	99,0% (196)	98,8% (170)

Solamente se han tipificado las muestras positivas por la PCR con Gp5+/6+.

^a Incluyendo muestras positivas y negativas en PCR y NASBA múltiple simultáneo en tiempo real. ^b Incluyendo solamente las muestras positivas en PCR y/o en NASBA múltiple simultáneo en tiempo real. ^c ASCUS excluyendo los frotis dudosos.

Ejemplo 5

Se proporciona un kit para la detección de transcritos de ARNm del(los) gen(es) E6 de HPV, conteniendo el kit uno o más de, dos o más de, y preferiblemente todos, los pares de cebadores siguientes y las sondas de identificación acompañantes.

HPV 16:HPV 16.txt 7905 pb

HPV16P2:

p2:116 (20) GATGCAAGGTCGCATATGAGCCACAGGAGCGACCCAGAAA

16 pI (n°7)

AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGG ATT CCC ATC TCT ATA TAC TA (51 bases)

HPV16PO2:

po:230 (20) TATGACTTTGCTTTTCGGGA

H16e6702po

ES 2 282 599 T3

HPV 18:HPV 18.txt 7857 pb

5 HPV18P2:
p2:698 (22) GATGCAAGGTCGCATATGAGGAAAACGATGAAATAGATGGAG
H18e6702p2
10 HPV18P4:
p1:817 (20) AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGGTCGTCTGCTGAGCTTTCT
H18e6703p1 (Múltiple)
15
HPV18PO2:
20 po:752 (21) GAACCACAACGTCACACAATG
H18e6702po

25 HPV 31:HPV 31.txt 7912 pb
HPV31P3:
30 p2:617 (20) GATGCAAGGTCGCATATGAGACTGACCTCCACTGTTATGA
H31e6703p2
p1:766 (20) AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTATCTACTTGTGTGCTCTGT
35 H31e6703p1
HPV31PO4:
40 Po:686 (26) GGACAAGCAGAACCGGACACATCCAA
H31e6704po

45 HPV 33:HPV 33.txt 7909 pb
HPV33P1:
50 p2:618 (22) GATGCAAGGTCGCATATGAGTATCCTGAACCAACTGACCTAT
H33e6701p2
p1:763 (19) AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTTGACACATAAACGAACTG
55 H33e6701p1

HPV33PO3:
60 po:699 (23) GGACAAGCACAACCAGCCACAAGC
H33e6703po

65

ES 2 282 599 T3

Como alternativa a las sondas mostradas anteriormente, el kit puede incluir opcionalmente una o más de las sondas moleculares fluorescentes (“beacons”) siguientes:

Sondas Moleculares Fluorescentes (“beacons”):

H16e6702mb2-FAM	ccagctTATGACTTTGCTTTTCGGGAagctgg
H18e6702mb1-TxR	cgcattgGAACCACAACGTCACACAATGcatgcg
H31e6704mb2-FAM	ccgtcgGGACAAGCAGAACCGGACACATCCAacgacgg
H33e6703mb1-FAM	ccaagcGGACAAGCACAACCAGCCACAGCgcttgg

Preferiblemente, el kit incluye también los siguientes pares de cebadores y sondas:

HPV 45:HPV 45.txt 7858 pb (X74479)

HPV45P1:

p2:430 (21) GATGCAAGGTCGCATATGAGAACCATTGAACCCAGCAGAAA

H45e6701p2

p1:527 (22) AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTCTTTCTTGCCGTGCCTGGTCA

H45e6701p1

HPV45PO1:

po:500 (20) GTACCGAGGGCAGTGTAAATA

H45e6701po

La sonda de HPV 45 anterior puede ser sustituida por una sonda molecular fluorescente para HPV según sigue:

H45e6701mb1 cgatcgtGTACCGAGGGCAGTGTAAATAcgatcg

Además, el kit puede incluir uno o más de los pares de cebadores y sondas de identificación acompañantes siguientes, dependiendo del área geográfica de utilización del kit.

HPV 52:HPV 52.txt 7942 pb (X74481)

HPV52P1:

p2:144 (22) GATGCAAGGTCGCATATGAGTTGTGTGAGGTGCTGGAAGAAT

H52e6701p2

p1:358 (18) AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCCTCTCTTCTAATGTTT

H52e6701p1

HPV52PO1:

Po:296 (20) GTGCCTACGCTTTTATCTA

H52e6701po

ES 2 282 599 T3

HPV 58:HPV 58.txt 7824 pb (D90400)

HPV58P2:

p2:173 (18) GATGCAAGGTCGCATATGAGTCTGTGCATGAAATCGAA

H58e6702p2

p1:291 (18) AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGAGCACACTTTACATACTG

H58e6702p1

HPV58PO2:

po:218 (22) TTGCAGCGATCTGAGGTATATG

H58e6702po

HPV 51:HPV 51.txt 7808 pb (M62877)

HPV51PA/P:

p2:655 (23) GATGCAAGGTCGCATATGAG AGA GGA GGA GGA TGA AGT AGA TA

H51e6702p2

p1:807 (20) AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGCCCATTAACAT CTG CTG TA

H51e6701p1

HPV51POA:

po:771 (24) TGG CAG TGG AAA GCA GTG GAG ACA

H51e6702po

Las sondas anteriormente mostradas pueden ser sustituidas en el kit por las sondas moleculares fluorescentes ("beacons") siguientes:

H52e6701mb1 cgatcgGTGCCTACGCTTTTATCTAcgatcg

H58e6702mb1 ccgtcgTTGCAGCGATCTGAGGTATATGcgacgg

H51e6702mb1 cgatcgTTG CAG TGG AAA GCA GTG GAG ACACgatcg

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para el cribado de sujetos humanos con el fin de determinar su riesgo de desarrollar carcinoma cervical, método que comprende la selección del sujeto por la expresión de transcritos de ARNm del gen E6 de cada uno, y únicamente, de los tipos de HPV 16, 18, 31, 33 y 45 utilizando una técnica de amplificación y clasificando al sujeto en una de dos categorías de riesgo de desarrollar carcinoma cervical sobre la base de la expresión del ARNm de E6 de al menos uno de dichos tipos de HPV, en el que los individuos positivos para la expresión de dicho ARNm de E6 de al menos uno de dichos tipos de HPV son calificados como portadores de HPV integrado y son por tanto clasificados como de alto riesgo de desarrollar carcinoma cervical, mientras que los individuos negativos para la expresión de todos los ARNm de E6 son calificados como no portadores de HPV integrado y son por tanto clasificados como sin riesgo detectable de desarrollar carcinoma cervical.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la selección por dicha expresión del ARNm de E6 es llevada a cabo utilizando una amplificación isotérmica en combinación con la detección en tiempo real del producto de amplificación.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la amplificación isotérmica es NASBA, una amplificación mediada por la transcripción, una amplificación de ARN mediada por una señal o una amplificación isotérmica en fase de solución.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la selección por dicha expresión del ARNm de E6 es llevada a cabo utilizando NASBA en tiempo real.

5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los sujetos humanos son sujetos previamente identificados como infectados con ADN del virus del papiloma humano en células del cérvix.

6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los sujetos humanos son sujetos con un diagnóstico previo de ASCUS, lesiones CIN I o condiloma.

FIG. 1A.

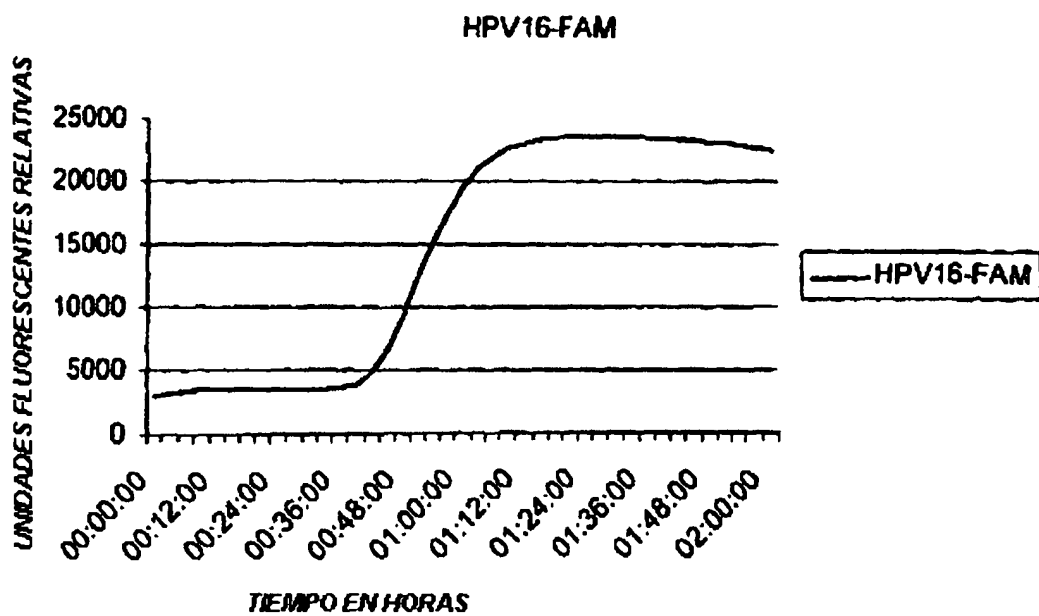


FIG. 1B.

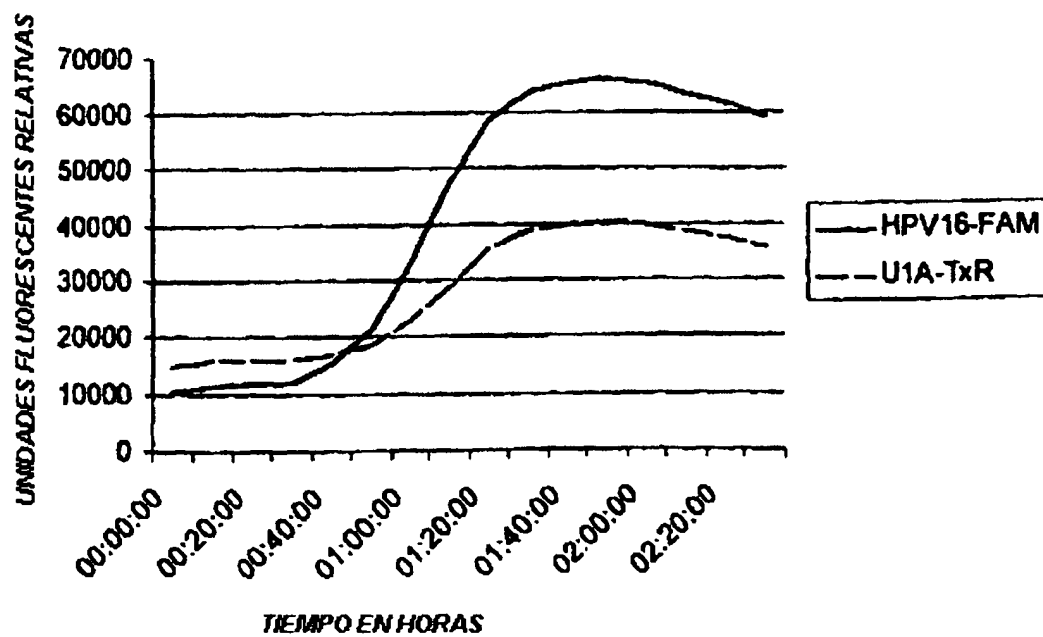


FIG. 2A.

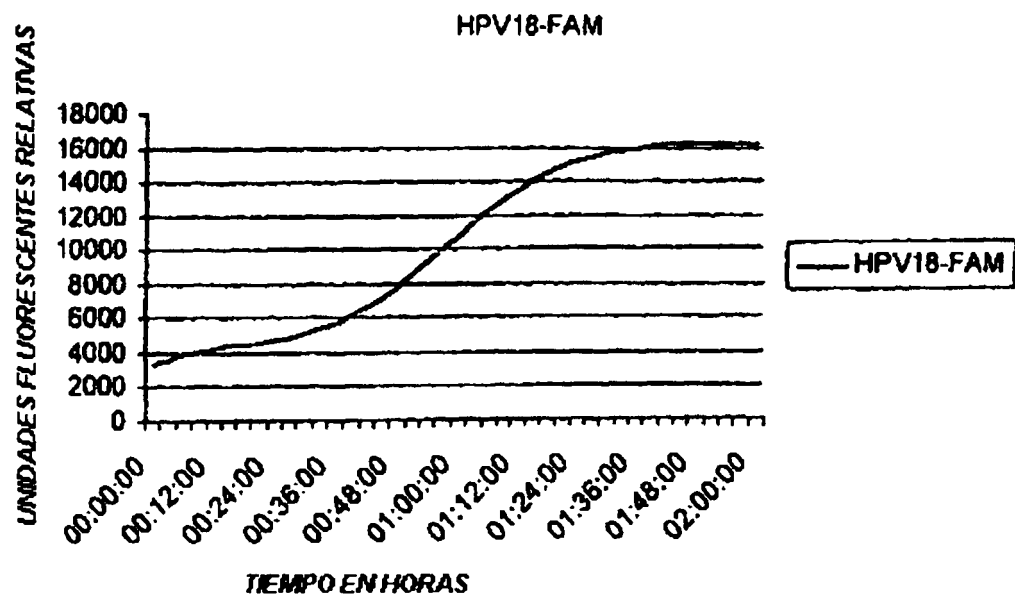


FIG. 2B.

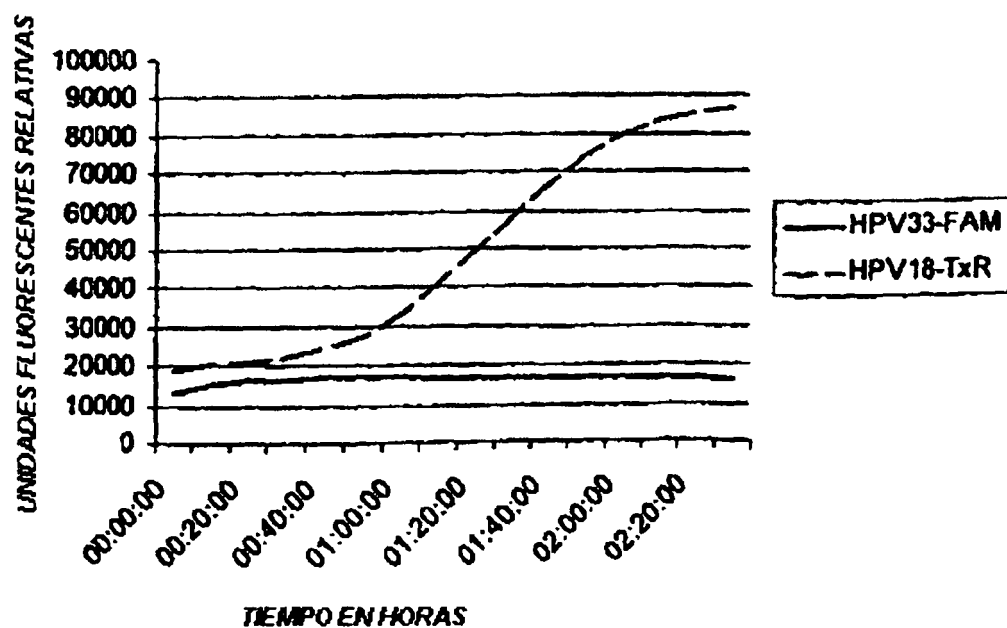


FIG. 3A.

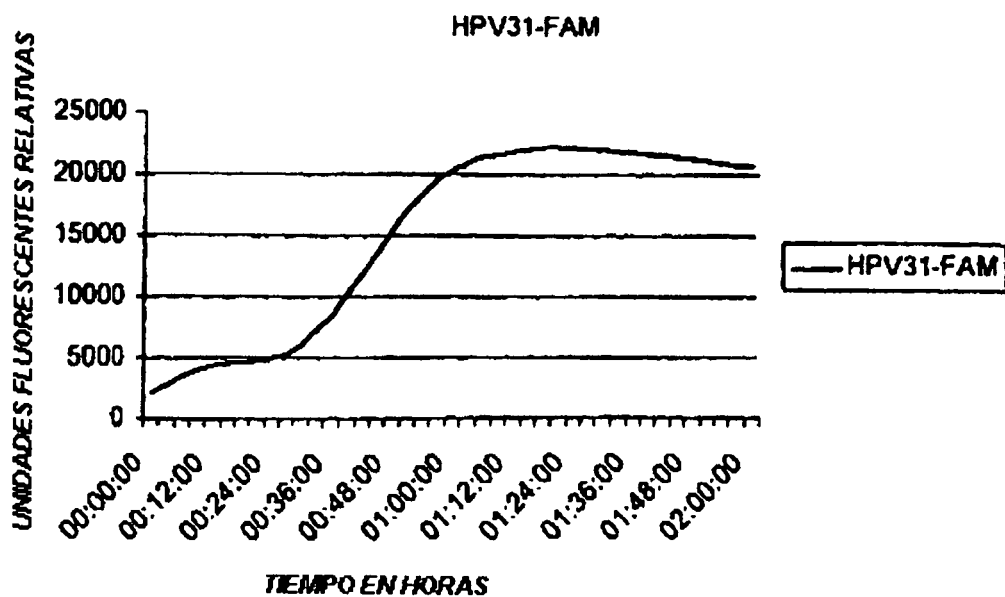


FIG. 3B.

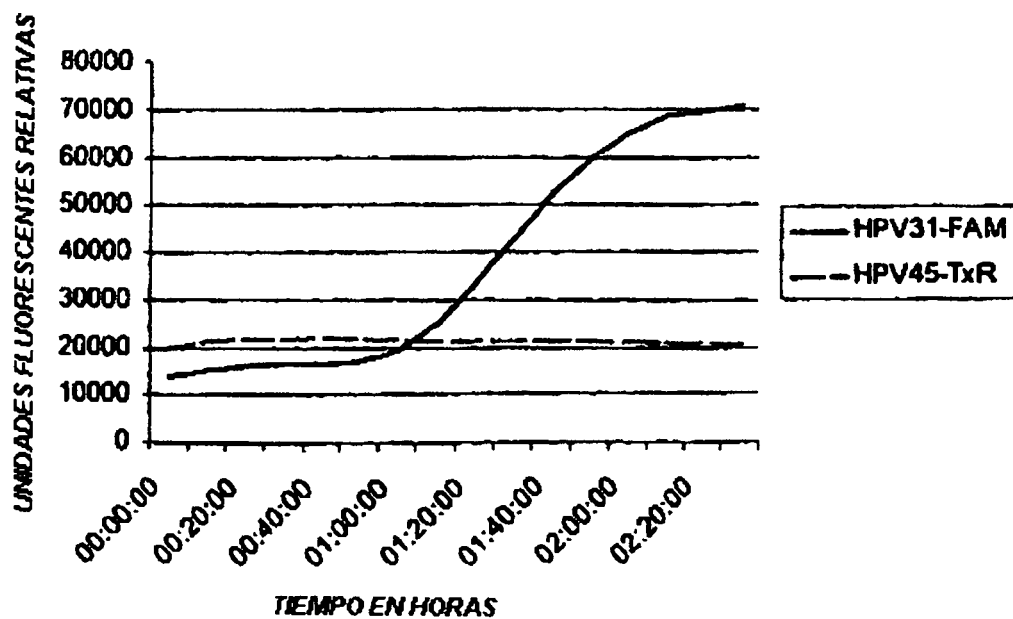


FIG. 4A.

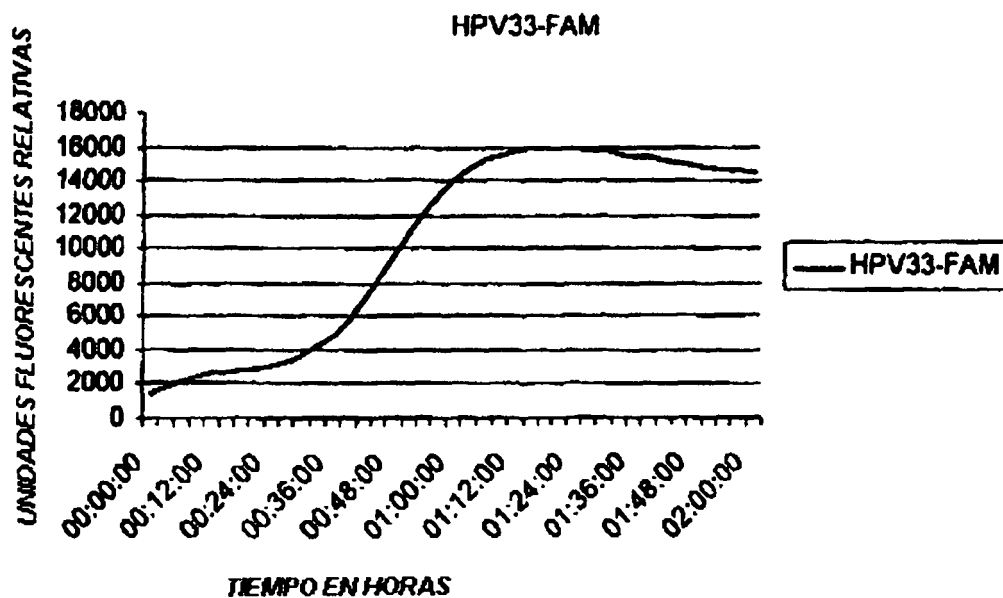


FIG. 4B.

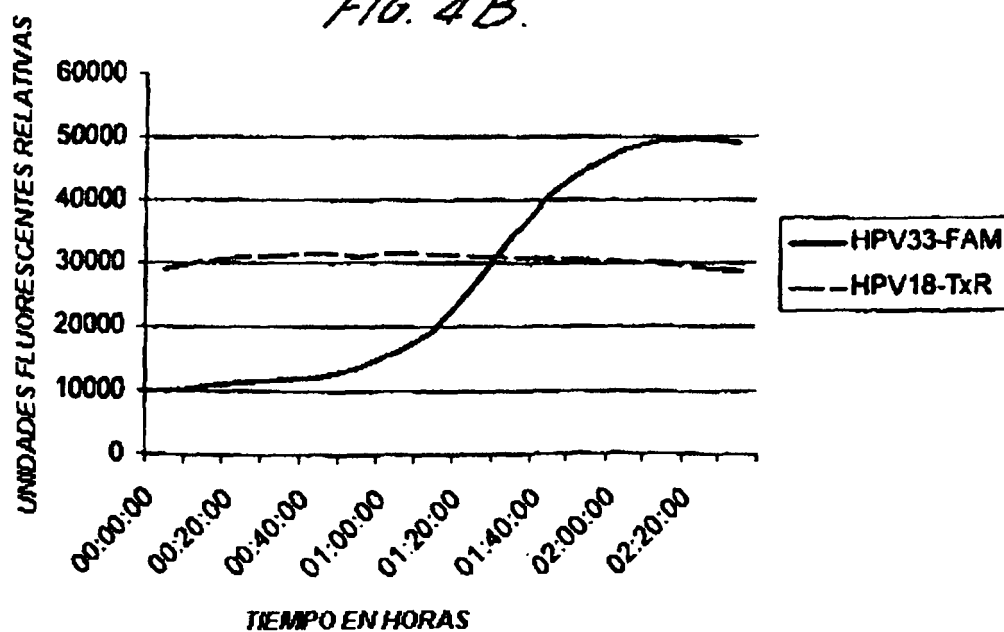


FIG. 5A.

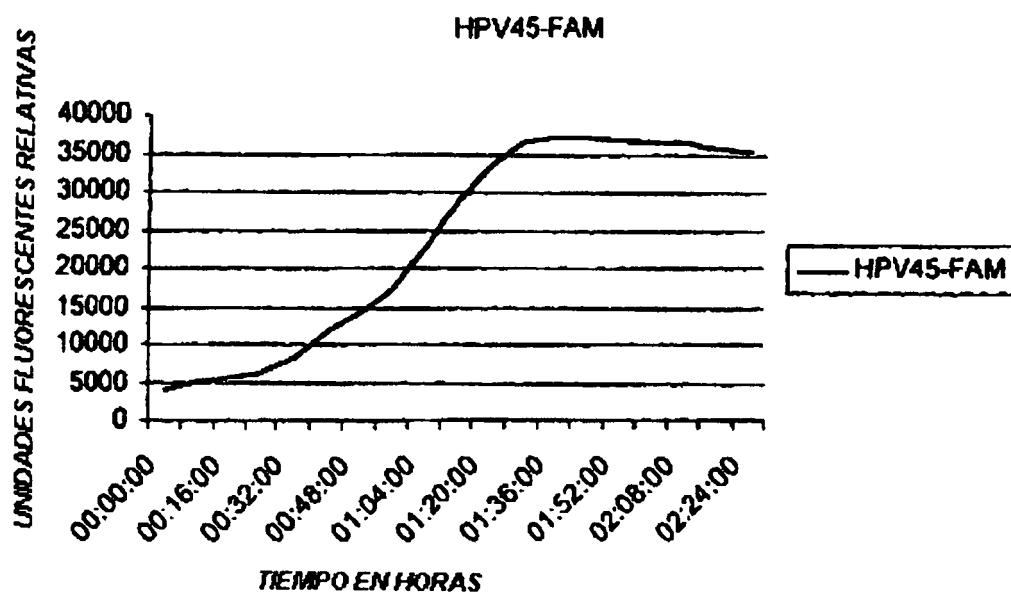


FIG. 5B.

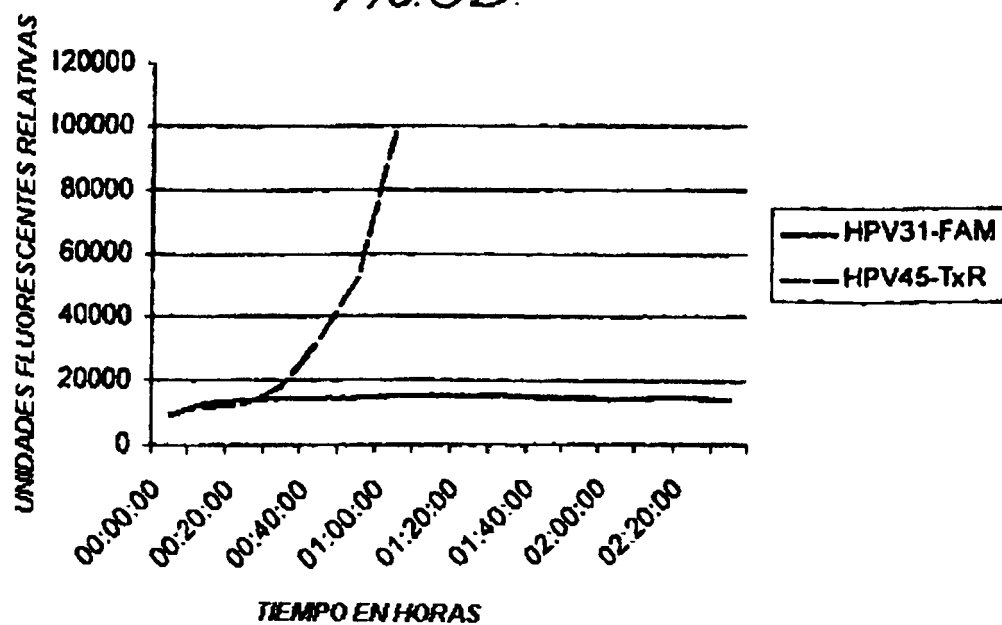
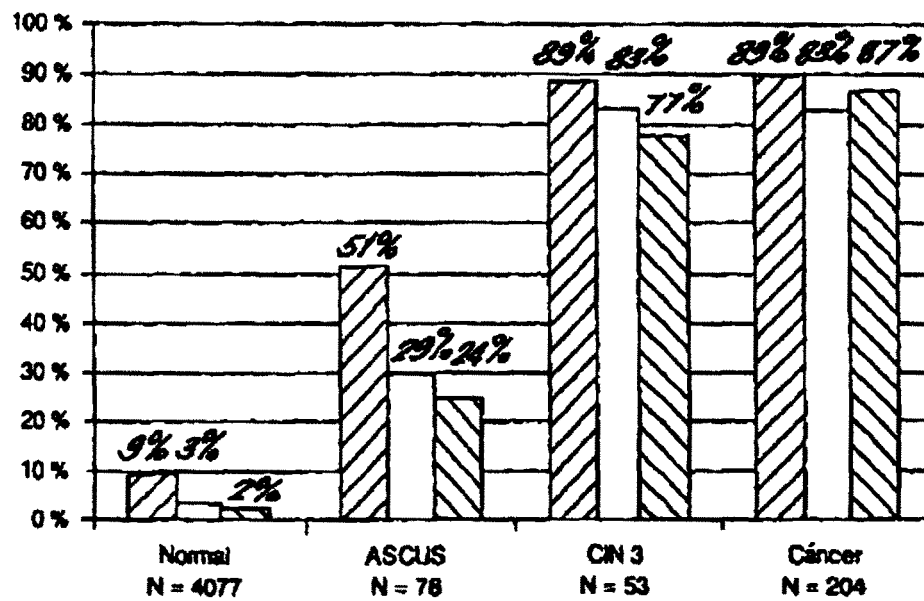


FIG. 6.



▨ PCR Consenso
 □ Tipificación por PCR
 ▩ HPV-Proofer

ES 2 282 599 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> NORCHIP A/S	
5	<120> MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE ARNm DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	
	<130> SCB/NLW/58858/001	
	<160> 345	
	<170> PatentIn Versión 3.1	
10	<210> 1	
	<211> 24	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<400> 1	
20	ccacaggagc gaccagaaa gtta	24
	<210> 2	
	<211> 22	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador de HPV	
	<400> 2	
35	acggtttgtt gtattgctgt tc	22
	<210> 3	
	<211> 20	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
45	<400> 3	
50	ccacaggagc gaccagaaa	20
	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
60	<400> 4	
	ggtttgttgt attgctgttc	20
65	<210> 5	
	<211> 20	

ES 2 282 599 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador de HPV	
	<400> 5	
10	attcccatct ctatatacta	20
	<210> 6	
	<211> 18	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de HPV	
	<400> 6	
25	tcacgtcgca gtaactgt	18
	<210> 7	
	<211> 18	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
35	<400> 7	
40	ttgcttgacg tacacaca	18
	<210> 8	
	<211> 18	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
50	<400> 8	
	tgcagtacac acattcta	18
55	<210> 9	
	<211> 18	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
65	<400> 9	
	gcagtacaca cattctaa	18

ES 2 282 599 T3

	<210> 10	
	<211> 18	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
10	<400> 10	
	acagttatgc acagagct	18
15	<210> 11	
	<211> 18	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
25	<400> 11	
	atattagaat gtgtgtac	18
30	<210> 12	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
40	<400> 12	
	ttagaatgtg tgtactgc	18
45	<210> 13	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
55	<400> 13	
	gaatgtgtgt actgcaag	18
60	<210> 14	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Sonda de HPV	

ES 2 282 599 T3

	<400> 14	
	acagttatgc acagagct	18
5	<210> 15	
	<211> 18	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
15	<400> 15	
	atattagaat gtgtgtac	18
20	<210> 16	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
30	<400> 16	
	ttagaatgtg tgtactgc	18
35	<210> 17	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
	<400> 17	
45	gaatgtgtgt actgcaag	18
	<210> 18	
50	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Sonda de HPV	
	<400> 18	
60	ctttgctttt cgggatttat gc	22
	<210> 19	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 282 599 T3

	<220>		
	<223> Sonda de HPV		
5	<400> 19		
	tatgactttg cttttcgga		20
10	<210> 20		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Sonda de HPV		
	<400> 20		
20	tatgactttg cttttcgga		20
	<210> 21		
25	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Cebador de HPV		
	<400> 21		
35	cagaggagga ggatgaaata gta		23
	<210> 22		
40	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Cebador de HPV		
	<400> 22		
50	gcacaaccga agcgtagagt cacac		25
	<210> 23		
	<211> 24		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda de HPV		
60	<400> 23		
	tggacaagca gaaccggaca gagc		24
65	<210> 24		
	<211> 22		

ES 2 282 599 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador de HPV	
	<400> 24	
10	cagaggagga g gatgaaata ga	22
	<210> 25	
	<211> 22	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de HPV	
	<400> 25	
25	gcacaaccga agcgtagagt ca	22
	<210> 26	
	<211> 24	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
35	<400> 26	
	agcagaaccg gacagagccc atta	24
40	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
50	<400> 27	
	acgatgaaat agatggagtt	20
55	<210> 28	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
65	<400> 28	
	cacggacaca caaaggacag	20

ES 2 282 599 T3

	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
10	<400> 29	
	agccgaacca caacgtcaca	20
15	<210> 30	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
25	<400> 30	
	gaaaacgatg aaatagatgg ag	22
30	<210> 31	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
40	<400> 31	
	acaccacgga cacacaaagg acag	24
45	<210> 32	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
	<400> 32	
55	gaaccacaac gtcacacaat g	21
60	<210> 33	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Sonda de HPV	

ES 2 282 599 T3

	<400> 33	
	gaaccacaac gtcacacaat g	21
5	<210> 34	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
15	<400> 34	
	ttccggttga ccttctatgt	20
20	<210> 35	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
30	<400> 35	
	ggtcgtctgc tgagctttct	20
35	<210> 36	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
	<400> 36	
45	gcaagacata gaaataacct g	21
	<210> 37	
50	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador de HPV	
	<400> 37	
60	accagtggt agttagtt	18
	<210> 38	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 282 599 T3

	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
5	<400> 38	
	tgcaagacag tattggaact	20
10	<210> 39	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
	<400> 39	
20	ggaaataccc tacgatgaac	20
	<210> 40	
25	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
	<400> 40	
35	ggacacaacg gtctttgaca	20
	<210> 41	
40	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Sonda de HPV	
	<400> 41	
50	atagggacga cacaccacac ggag	24
	<210> 42	
	<211> 22	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Cebador de HPV	
	<400> 42	
65	ggaaataccc tacgatgaac ta	22
	<210> 43	
	<211> 22	

ES 2 282 599 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador de HPV	
	<400> 43	
10	ctggacacaa cggcttttga ca	22
	<210> 44	
	<211> 22	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Sonda de HPV	
	<400> 44	
25	tagggacgac acaccacacg ga	22
	<210> 45	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
35	<400> 45	
	actgacctcc actgttatga	20
40	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
50	<400> 46	
	tatctacttg tgtgctctgt	20
55	<210> 47	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
65	<400> 47	
	gacaagcaga accggacaca tc	22

ES 2 282 599 T3

	<210> 48	
	<211> 24	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
10	<400> 48	
	tgacctccac tgttatgagc aatt	24
15	<210> 49	
	<211> 26	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
25	<400> 49	
	tgcgaatata tacttgtgtg ctctgt	26
30	<210> 50	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
40	<400> 50	
	ggacaagcag aaccggacac atccaa	26
45	<210> 51	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
55	<400> 51	
	ggacaagcag aaccggacac atccaa	26
60	<210> 52	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Cebador de HPV	

ES 2 282 599 T3

	<400> 52	
	actgacctcc actgttat	18
5	<210> 53	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
15	<400> 53	
	cacgattcca aatgagccca t	21
20	<210> 54	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
30	<400> 54	
	tatcctgaac caactgacct at	22
35	<210> 55	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
	<400> 55	
45	ttgacacata aacgaactg	19
	<210> 56	
50	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Sonda de HPV	
	<400> 56	
60	cagatggaca agcacaacc	19
	<210> 57	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 282 599 T3

	<220>		
	<223> Cebador de HPV		
5	<400> 57		
	tcttgaacca actgacctat		20
10	<210> 58		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador de HPV		
	<400> 58		
20	cccataagta gttgctgtat		20
	<210> 59		
25	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Sonda de HPV		
	<400> 59		
35	ggacaagcac aaccagccac agc		23
	<210> 60		
40	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Sonda de HPV		
	<400> 60		
50	ggacaagcac aaccagccac agc		23
	<210> 61		
	<211> 20		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de HPV		
60	<400> 61		
	gacctttgtg tctcaagaa		20
65	<210> 62		
	<211> 20		

ES 2 282 599 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador de HPV	
	<400> 62	
10	aggtcagttg gttcaggata	20
	<210> 63	
	<211> 21	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Sonda de HPV	
	<400> 63	
25	agaaactgca ctgtgacgtg t	21
	<210> 64	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
35	<400> 64	
	attacagcgg agtgaggat	20
40	<210> 65	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
50	<400> 65	
	gtctttgctt ttcaactgga	20
55	<210> 66	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
65	<400> 66	
	atagagaagg ccagccatat	20

ES 2 282 599 T3

	<210> 67	
	<211> 22	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
10	<400> 67	
	tcagaggagg aggaagatac ta	22
15	<210> 68	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
25	<400> 68	
	gattatgctc tctgtgaaca	20
30	<210> 69	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
40	<400> 69	
	cccgaggcaa ctgacctata	20
45	<210> 70	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
	<400> 70	
55	gtcaatgtgt gtgctctgta	20
60	<210> 71	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Sonda de HPV	

ES 2 282 599 T3

	<400> 71	
	gacaagcaaa accagacacc tccaa	25
5	<210> 72	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
15	<400> 72	
	gacaagcaaa accagacacc	20
20	<210> 73	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
30	<400> 73	
	ttgtgtgagg tgctggaaga at	22
	<210> 74	
35	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
	<400> 74	
45	ccctctcttc taatgttt	18
	<210> 75	
50	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Sonda de HPV	
	<400> 75	
60	gtgcctacgc ttttatcta	20
	<210> 76	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 282 599 T3

	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
5	<400> 76	
	gtgcctacgc ttttatcta	20
10	<210> 77	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
	<400> 77	
20	ggggtctcca acactctgaa ca	22
	<210> 78	
25	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Sonda de HPV	
	<400> 78	
35	tgcaaacaag cgatttca	18
	<210> 79	
40	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador de HPV	
	<400> 79	
50	tcaggcgttg gagacatc	18
	<210> 80	
	<211> 18	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
60	<400> 80	
	agcaatcgta agcacact	18
65	<210> 81	
	<211> 18	

ES 2 282 599 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador de HPV	
	<400> 81	
10	tctgtgcatg aaatcgaa	18
	<210> 82	
	<211> 18	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de HPV	
	<400> 82	
25	agcacacttt acatactg	18
	<210> 83	
	<211> 18	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
35	<400> 83	
40	tgaaatgcgt tgaatgca	18
	<210> 84	
	<211> 22	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
50	<400> 84	
	ttgcagcgat ctgaggtata tg	22
55	<210> 85	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
65	<400> 85	
	tacactgctg gacaacat	18

ES 2 282 599 T3

	<210> 86	
	<211> 18	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
10	<400> 86	
	tcattctctg agctgtct	18
15	<210> 87	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
25	<400> 87	
	tacactgctg gacaacatgc a	21
30	<210> 88	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
40	<400> 88	
	gtcacatcca cagcaacagg tca	23
45	<210> 89	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
	<400> 89	
55	gtaggggttac attgctatga	20
60	<210> 90	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Sonda de HPV	

ES 2 282 599 T3

	<400> 90	
	gtagggttac attgctatga gc	22
5	<210> 91	
	<211> 22	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
15	<400> 91	
	tgacctgttg ctgtggatgt ga	22
20	<210> 92	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
30	<400> 92	
	tacctgaatc gtccgcat	19
35	<210> 93	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
45	<400> 93	
	atwgtgtgtc ccatctgc	18
50	<210> 94	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
60	<400> 94	
	catgccataa atgtataga	19
65	<210> 95	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 282 599 T3

	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
5	<400> 95	
	caccgcaggc accttattaa	20
10	<210> 96	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
	<400> 96	
20	agaattagag aattaaga	18
	<210> 97	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador de HPV	
	<400> 97	
35	gcagacgacc actacagcaa a	21
	<210> 98	
40	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador de HPV	
	<400> 98	
50	acaccgagtc cgagtaata	19
	<210> 99	
	<211> 19	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
60	<400> 99	
	atagggacgg ggaaccact	19
65	<210> 100	
	<211> 19	

ES 2 282 599 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador de HPV	
	<400> 100	
10	tattactcgg actcgtgt	19
	<210> 101	
	<211> 21	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de HPV	
	<400> 101	
25	cttgggttc tctcgtgtt a	21
	<210> 102	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
35	<400> 102	
	ggaccacaaa acgggaggac	20
40	<210> 103	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
50	<400> 103	
	gaaatagatg aacccgacca	20
55	<210> 104	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
65	<400> 104	
	gcacaccacg gacacacaaa	20

ES 2 282 599 T3

	<210> 105	
	<211> 24	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
10	<400> 105	
	tagccagacg ggatgaacca cagc	24
15	<210> 106	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
25	<400> 106	
	aaccattgaa cccagcagaa a	21
30	<210> 107	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
40	<400> 107	
	tctttcttgc cgtgcctggt ca	22
45	<210> 108	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
	<400> 108	
55	gtaccgaggg cagtgaata	20
60	<210> 109	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Cebador de HPV	

ES 2 282 599 T3

	<400> 109	
	aaccattgaa cccagcagaa a	21
5	<210> 110	
	<211> 22	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
15	<400> 110	
	tctttcttgc cgtgcctggt ca	22
20	<210> 111	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
30	<400> 111	
	gaaaccattg aaccagcag aaaa	24
35	<210> 112	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
	<400> 112	
45	ttgtatact tgtgtttccc tacg	24
	<210> 113	
50	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Sonda de HPV	
	<400> 113	
60	gtaccgaggg cagtgaata	20
	<210> 114	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 282 599 T3

	<220>		
	<223> Sonda de HPV		
5	<400> 114		
	ggacaaacga agatttcaca		20
10	<210> 115		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador de HPV		
	<400> 115		
20	gttgacctgt tgtgtacca gcaat		25
	<210> 116		
25	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Cebador de HPV		
	<400> 116		
35	caccacggac acacaaagga caag		24
	<210> 117		
40	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Cebador de HPV		
	<400> 117		
50	ctgttgacct gttgtgttac ga		22
	<210> 118		
	<211> 22		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de HPV		
60	<400> 118		
	ccacggacac acaaaggaca ag		22
65	<210> 119		
	<211> 20		

ES 2 282 599 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador de HPV	
	<400> 119	
10	gttgacctgt tgtgttacga	20
	<210> 120	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de HPV	
	<400> 120	
25	acggacacac aaaggacaag	20
	<210> 121	
	<211> 22	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
35	<400> 121	
40	gagtcagagg aggaaaacga tg	22
	<210> 122	
	<211> 25	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
50	<400> 122	
	aggaaaacga tgaagcagat ggagt	25
55	<210> 123	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
65	<400> 123	
	acaactacca gcccgcagag ccgaa	25

ES 2 282 599 T3

	<210> 124	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
10	<400> 124	
	ggaggaggat gaagtagata	20
15	<210> 125	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
25	<400> 125	
	gcccattaac atctgctgta	20
30	<210> 126	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
40	<400> 126	
	agaggaggag gatgaagtag ata	23
45	<210> 127	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
	<400> 127	
55	acgggcaaac caggcttagt	20
	<210> 128	
60	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Sonda de HPV	

ES 2 282 599 T3

	<400> 128	
	gcaggtgttc aagttagta	20
5	<210> 129	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
15	<400> 129	
	tggcagtggg aagcagtggg gaca	24
20	<210> 130	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
30	<400> 130	
	ttggggtgct ggagacaaac atct	24
35	<210> 131	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
45	<400> 131	
	ttcatctca tcctcatcct ctga	24
50	<210> 132	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
	<400> 132	
60	tggggtgctg gagacaaaca tc	22
65	<210> 133	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 282 599 T3

	<220>		
	<223> Cebador de HPV		
5	<400> 133		
	catcctcatc ctcacctct ga		22
10	<210> 134		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador de HPV		
	<400> 134		
20	ttgggtgct ggagacaaac at		22
	<210> 135		
25	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Cebador de HPV		
	<400> 135		
35	ccacaaactt acactcaca ca		22
	<210> 136		
40	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Sonda de HPV		
	<400> 136		
50	aaagtaccaa cgctgcaaga cgt		23
	<210> 137		
	<211> 24		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda de HPV		
60	<400> 137		
	agaactaaca cctcaaacag aaat		24
65	<210> 138		
	<211> 22		

ES 2 282 599 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Sonda de HPV	
	<400> 138	
10	agtaccaacg ctgcaagacg tt	22
	<210> 139	
	<211> 22	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de HPV	
	<400> 139	
25	ttggacagct cagaggatga gg	22
	<210> 140	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
35	<400> 140	
40	gatttcctt atgcagtgtg	20
	<210> 141	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
50	<400> 141	
	gacatctgta gcaccttatt	20
55	<210> 142	
	<211> 20	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
65	<400> 142	
	gactattcag tgtatggagc	20

ES 2 282 599 T3

	<210> 143	
	<211> 22	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
10	<400> 143	
	caactgayct myactgttat ga	22
15	<210> 144	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
25	<400> 144	
	caactgayct myactgttat ga	22
30	<210> 145	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
40	<400> 145	
	gaamcaactg acctaywctg ctat	24
45	<210> 146	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
55	<400> 146	
	gaamcaactg acctaywctg ctat	24
60	<210> 147	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Sonda de HPV	

ES 2 282 599 T3

	<400> 147	
	aagacattat tcagactc	18
5	<210> 148	
	<211> 18	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
15	<400> 148	
	aagacattat tcagactc	18
20	<210> 149	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
30	<400> 149	
	aatggcattt gttggggtaa	20
35	<210> 150	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
	<400> 150	
45	tcatattcct ccccatgtc	19
	<210> 151	
50	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Sonda de HPV	
	<400> 151	
60	ttgttactgt tgttgatact ac	22
	<210> 152	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 282 599 T3

	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
5	<400> 152	
	aatggcattt gttggsrhaa	20
10	<210> 153	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
	<400> 153	
20	tcatatctct cmmcatgdc	19
	<210> 154	
25	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Sonda de HPV	
	<400> 154	
35	ttgttactgt tgttgatacy ac	22
	<210> 155	
40	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Sonda de HPV	
	<400> 155	
50	ttgttactgt tgttgatacc ac	22
	<210> 156	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
60	<220>	
	<221> características varias	
	<222> (17)..(17)	
65	<223> “n” representa inosina	
	<220>	
	<221> características varias	

ES 2 282 599 T3

	<222> (18)..(18)	
	<223> “n” representa inosina	
5	<400> 156	
	aatggcattt gttggsnnaa	20
10	<210> 157	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
	<220>	
20	<221> características varias	
	<222> (16)..(16)	
	<223> “n” representa inosina	
	<220>	
25	<221> características varias	
	<222> (17)..(17)	
	<223> “n” representa inosina	
30	<400> 157	
	aatggcattt gttggnnhaa	20
35	<210> 158	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
	<220>	
45	<221> características varias	
	<222> (16)..(16)	
	<223> “n” representa inosina	
	<220>	
50	<221> características varias	
	<222> (18)..(18)	
	<223> “n” representa inosina	
55	<400> 158	
	aatggcattt gttggnrnaa	20
60	<210> 159	
	<211> 20	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	

ES 2 282 599 T3

	<400> 159	
	actggcattt gttgggtaa	20
5	<210> 160	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
15	<400> 160	
	aatggcattt gttgggaaa	20
20	<210> 161	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
30	<400> 161	
	aatggcattt gttggcataa	20
35	<210> 162	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
45	<400> 162	
	aatggcattt gttggggcaa	20
50	<210> 163	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
60	<400> 163	
	aatggcattt gttggcaca	20
65	<210> 164	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 282 599 T3

	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
	<220>	
5	<221> características varias	
	<222> (13)..(13)	
	<223> “n” representa inosina	
	<220>	
10	<221> características varias	
	<222> (18)..(18)	
	<223> “n” representa inosina	
15	<400> 164	
	tcattattcct cmncatgnc	19
20	<210> 165	
	<211> 19	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
	<220>	
30	<221> características varias	
	<222> (18)..(18)	
	<223> “n” representa inosina	
35	<400> 165	
	tcattattcct caacatgnc	19
40	<210> 166	
	<211> 19	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de HPV	
	<220>	
50	<221> características varias	
	<222> (12)..(12)	
	<223> “n” representa inosina	
	<220>	
55	<221> características varias	
	<222> (13)..(13)	
	<223> “n” representa inosina	
60	<400> 166	
	tcattattcct cncatgnc	19
65	<210> 167	
	<211> 19	

ES 2 282 599 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador de HPV
 <220>
 <221> características varias
 10 <222> (12)..(12)
 <223> “n” representa inosina
 <220>
 <221> características varias
 15 <222> (13)..(13)
 <223> “n” representa inosina

<400> 167
 20
 tcatattcct cncatggc

19

<210> 168
 25 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Cebador de HPV
 <220>
 <221> características varias
 35 <222> (12)..(12)
 <223> “n” representa inosina
 <220>
 <221> características varias
 40 <222> (13)..(13)
 <223> “n” representa inosina

<400> 168
 45
 tcatattcct cncatgac

19

<210> 169
 50 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Cebador de HPV
 <220>
 <221> características varias
 60 <222> (12)..(12)
 <223> “n” representa inosina
 <220>
 <221> características varias
 65 <222> (13)..(13)
 <223> “n” representa inosina

ES 2 282 599 T3

	<400> 169	
	tcatattcct cnncatgcc	19
5	<210> 170	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia para ser incorporada en los cebadores del NASBA a fin de facilitar la hibridación con la sonda de detección universal ECL	
15	<400> 170	
	gatgcaaggt cgcatatgag	20
20	<210> 171	
	<211> 25	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia promotora para ser incorporada en los oligonucleótidos cebadores P1 del NASBA	
30	<400> 171	
	aattctaata cgactcacta taggg	25
35	<210> 172	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Secuencia promotora para ser incorporada en los oligonucleótidos cebadores P1 del NASBA	
45	<400> 172	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag g	31
50	<210> 173	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 173	
60	gatgcaaggt cgcatatgag ccacaggagc gaccagaaa gtta	44
	<210> 174	
65	<211> 53	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 282 599 T3

	<220>		
	<223> Cebador de NASBA para HPV		
5	<400> 174		
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gacggttgtg tgtattgctg ttc		53
10	<210> 175		
	<211> 40		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador de NASBA para HPV		
	<400> 175		
20	gatgcaaggt cgcatatgag ccacaggagc gaccagaaaa		40
	<210> 176		
25	<211> 51		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Cebador de NASBA para HPV		
	<400> 176		
35	aattctaata cgactcacta tagggagaag gggtttgtg tattgctgtt c		51
	<210> 177		
40	<211> 51		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Cebador de NASBA para HPV		
	<400> 177		
50	aattctaata cgactcacta tagggagaag gattcccatc tctatatact a		51
	<210> 178		
	<211> 49		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de NASBA para HPV		
60	<400> 178		
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcacgtcgc agtaactgt		49
65	<210> 179		
	<211> 49		

ES 2 282 599 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 179	
10	aattctaata cgactcacta tagggagaag gttgcttgca gtacacaca	49
	<210> 180	
	<211> 49	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 180	
25	aattctaata cgactcacta tagggagaag gtgcagtaca cacattcta	49
	<210> 181	
	<211> 49	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
35	<400> 181	
40	aattctaata cgactcacta tagggagaag ggcagtacac acattctaa	49
	<210> 182	
	<211> 38	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
50	<400> 182	
	gatgcaaggt cgcatatgag acagttatgc acagagct	38
55	<210> 183	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
65	<400> 183	
	gatgcaaggt cgcatatgag atattagaat gtgtgtac	38

ES 2 282 599 T3

	<210> 184	
	<211> 38	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
10	<400> 184	
	gatgcaaggt cgcatatgag ttagaatgtg tgtactgc	38
15	<210> 185	
	<211> 38	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
25	<400> 185	
	gatgcaaggt cgcatatgag gaatgtgtgt actgcaag	38
30	<210> 186	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
40	<400> 186	
	cgcatgtatg actttgcttt tcgggacatg cg	32
45	<210> 187	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
55	<400> 187	
	ccagcttatg actttgcttt tcgggaagct gg	32
60	<210> 188	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	

ES 2 282 599 T3

	<400> 188	
	cacgctatga ctttgctttt cgggagcgtg	30
5	<210> 189	
	<211> 32	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
15	<400> 189	
	cgatcgatg actttgcttt tcgggacgat cg	32
20	<210> 190	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
30	<400> 190	
	gatgcaaggt cgcatatgag cagaggagga ggatgaaata gta	43
35	<210> 191	
	<211> 56	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
45	<400> 191	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag ggcacaaccg aagcgtagag tcacac	56
50	<210> 192	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
60	<400> 192	
	gatgcaaggt cgcatatgag cagaggagga ggatgaaata ga	42
65	<210> 193	
	<211> 53	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 282 599 T3

	<220>		
	<223> Cebador de NASBA para HPV		
5	<400> 193		
	aattctaata cgactcacta tagggagaag ggcacaaccg aagegtagag tca		53
10	<210> 194		
	<211> 40		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador de NASBA para HPV		
	<400> 194		
20	gatgcaaggt cgcatatgag acgatgaaat agatggagtt		40
	<210> 195		
25	<211> 51		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Cebador de NASBA para HPV		
	<400> 195		
35	aattctaata cgactcacta tagggagaag gcacggacac acaaaggaca g		51
	<210> 196		
40	<211> 42		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Cebador de NASBA para HPV		
	<400> 196		
50	gatgcaaggt cgcatatgag gaaaacgatg aatagatgg ag		42
	<210> 197		
	<211> 55		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de NASBA para HPV		
60	<400> 197		
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gacaccacgg acacacaaag gacag		55
65	<210> 198		
	<211> 33		

ES 2 282 599 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 198	
10	cgcatggaac cacaacgtca cacaatgcat gcg	33
	<210> 199	
	<211> 33	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 199	
25	ccgtcggaac cacaacgtca cacaatgcga cgg	33
	<210> 200	
	<211> 33	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
35	<400> 200	
40	cggaccgaac cacaacgtca cacaatgggt ccg	33
	<210> 201	
	<211> 33	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
50	<400> 201	
	cgatcggaac cacaacgtca cacaatgcga tcg	33
55	<210> 202	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
65	<400> 202	
	gatgcaaggt cgcatatgag ttccggtga ccttctatgt	40

ES 2 282 599 T3

	<210> 203	
	<211> 51	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
10	<400> 203	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gggctgtctg ctgagctttc	51
15	<210> 204	
	<211> 41	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
25	<400> 204	
	gatgcaaggt cgcatatgag gcaagacata gaaataacct g	41
30	<210> 205	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
40	<400> 205	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gaccagtgtagttagtt	49
45	<210> 206	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
55	<400> 206	
	gatgcaaggt cgcatatgag ggaaataccc tacgatgaac	40
60	<210> 207	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	

ES 2 282 599 T3

	<400> 207	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gggacacaac ggtctttgac a	51
5	<210> 208	
	<211> 42	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
15	<400> 208	
	gatgcaaggt cgcatatgag ggaaataccc tacgatgaac ta	42
20	<210> 209	
	<211> 53	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
30	<400> 209	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gctggacaca acggtctttg aca	53
35	<210> 210	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 210	
45	gatgcaaggt cgcatatgag actgacctcc actgttatga	40
	<210> 211	
50	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 211	
60	aattctaata cgactcacta tagggagaag gtatctactt gtgtgctctg t	51
	<210> 212	
	<211> 44	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 282 599 T3

	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
5	<400> 212	
	gatgcaaggt cgcatatgag tgacctccac tcttatgagc aatt	44
10	<210> 213	
	<211> 57	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 213	
20	aattctaata cgactcacta tagggagaag gtgcgaatat ctacttgtgt gctctgt	57
	<210> 214	
25	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 214	
35	ccgaagggga caagcagaac cggacacatc caaccttcgg	40
	<210> 215	
40	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 215	
50	ccgtcgggac aagcagaacc ggacacatcc aacgacgg	38
	<210> 216	
	<211> 40	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
60	<400> 216	
	cacgtcggga caagcagaac cggacacatc caacgacgtg	40
65	<210> 217	
	<211> 38	

ES 2 282 599 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 217	
10	cgcagcggac aagcagaacc ggacacatcc aagctgcg	38
	<210> 218	
	<211> 38	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 218	
25	cgatcgggac aagcagaacc ggacacatcc aacgatcg	38
	<210> 219	
	<211> 38	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
35	<400> 219	
40	gatgcaaggt cgcatatgag actgacctcc actgttat	38
	<210> 220	
	<211> 52	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
50	<400> 220	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gcacgattcc aaatgagccc at	52
55	<210> 221	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
65	<400> 221	
	gatgcaaggt cgcatatgag tctctgaac caactgacct at	42

ES 2 282 599 T3

	<210> 222	
	<211> 50	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
10	<400> 222	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gttgacacat aaacgaactg	50
15	<210> 223	
	<211> 40	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
25	<400> 223	
	gatgcaaggt cgcatatgag tctgaacca actgacatat	40
30	<210> 224	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
40	<400> 224	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gcccataagt agttgctgta t	51
45	<210> 225	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 225	
55	ccaagcggac aagcacaacc agccacagcg cttgg	35
60	<210> 226	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	

ES 2 282 599 T3

	<400> 226	
	ccaagcggga caagcacaac cagccacagc cgcttgg	37
5	<210> 227	
	<211> 35	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
15	<400> 227	
	cccagcggac aagcacaacc agccacagcg ctggg	35
20	<210> 228	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
30	<400> 228	
	ccaaagcggga caagcacaac cagccacagc gctttgg	37
	<210> 229	
35	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 229	
45	cctgcggaca agcacaacca gccacagcg agg	33
	<210> 230	
50	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 230	
60	cgatcgggac aagcacaacc agccacagcc gatcg	35
	<210> 231	
	<211> 40	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 282 599 T3

	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
5	<400> 231	
	gatgcaaggt cgcatatgag gacctttgtg tctcaagaa	40
10	<210> 232	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 232	
20	aattctaata cgactcacta tagggagaag gaggtcagtt ggttcaggat a	51
	<210> 233	
25	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 233	
35	gatgcaaggt cgcatatgag attacagcgg agtgaggtat	40
	<210> 234	
40	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 234	
50	aattctaata cgactcacta tagggagaag ggtctttgct tttaactgg a	51
	<210> 235	
	<211> 42	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
60	<400> 235	
	gatgcaaggt cgcatatgag tcagaggagg aggaagatac ta	42
65	<210> 236	
	<211> 51	

ES 2 282 599 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 236	
10	aattctaata cgactcacta tagggagaag ggattatgct ctctgtgaac a	51
	<210> 237	
	<211> 40	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 237	
25	gatgcaaggt cgcatatgag cccgaggcaa ctgacctata	40
	<210> 238	
	<211> 51	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
35	<400> 238	
40	aattctaata cgactcacta tagggagaag ggtcaatgtg tgtgtctgt a	51
	<210> 239	
	<211> 42	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
50	<400> 239	
	gatgcaaggt cgcatatgag ttgtgtgagg tgctggaaga at	42
55	<210> 240	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
65	<400> 240	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gccctctctt ctaatgttt	49

ES 2 282 599 T3

	<210> 241	
	<211> 40	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
10	<400> 241	
	gatgcaaggt cgcatatgag gtcctacgc ttttatcta	40
15	<210> 242	
	<211> 53	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
25	<400> 242	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gggggtctcc aacactctga aca	53
30	<210> 243	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
40	<400> 243	
	gatgcaaggt cgcatatgag tcaggcgttg gagacatc	38
45	<210> 244	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
55	<400> 244	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gagcaatcgt aagcacact	49
60	<210> 245	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	

ES 2 282 599 T3

	<400> 245	
	gatgcaaggt cgcatatgag tctgtgcatg aaatcgaa	38
5	<210> 246	
	<211> 49	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
15	<400> 246	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gagcacactt tacatactg	49
20	<210> 247	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
30	<400> 247	
	gatgcaaggt cgcatatgag tacactgctg gacaacat	38
35	<210> 248	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 248	
45	aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcattcttct gagctgtct	49
	<210> 249	
50	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 249	
60	gatgcaaggt cgcatatgag tacactgctg gacaacatgc a	41
	<210> 250	
	<211> 54	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 282 599 T3

	<220>		
	<223> Cebador de NASBA para HPV		
5	<400> 250		
	aattctaata cgactcacta tagggagaag ggtcacatcc acagcaacag gtca		54
10	<210> 251		
	<211> 42		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador de NASBA para HPV		
	<400> 251		
20	gatgcaaggt cgcatatgag tgacctgttg ctgtggatgt ga		42
	<210> 252		
25	<211> 50		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Cebador de NASBA para HPV		
	<400> 252		
35	aattctaata cgactcacta tagggagaag gtacctgaat cgtccaccat		50
	<210> 253		
40	<211> 39		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Cebador de NASBA para HPV		
	<400> 253		
50	gatgcaaggt cgcatatgag catgccataa atgtataga		39
	<210> 254		
	<211> 51		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de NASBA para HPV		
60	<400> 254		
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gcaccgcagg caccttatta a		51
65	<210> 255		
	<211> 41		

ES 2 282 599 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 255	
10	gatgcaaggt cgcatatgag gcagacgacc actacagcaa a	41
	<210> 256	
	<211> 50	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 256	
25	aattctaata cgactcacta tagggagaag gacaccgagt ccgagtaata	50
	<210> 257	
	<211> 39	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
35	<400> 257	
40	gatgcaaggt cgcatatgag tattactcgg actcgggtgt	39
	<210> 258	
	<211> 52	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
50	<400> 258	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gcttgggttt ctctcgtgt ta	52
55	<210> 259	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
65	<400> 259	
	gatgcaaggt cgcatatgag gaaatagatg aacccgacca	40

ES 2 282 599 T3

	<210> 260	
	<211> 51	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
10	<400> 260	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag ggcacaccac ggacacacaa a	51
15	<210> 261	
	<211> 41	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
25	<400> 261	
	gatgcaaggt cgcatatgag aaccattgaa cccagcagaa a	41
30	<210> 262	
	<211> 53	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
40	<400> 262	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gtctttcttg ccgtgcctgg tca	53
45	<210> 263	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
55	<400> 263	
	gatgcaaggt cgcatatgag aaccattgaa cccagcagaa a	41
60	<210> 264	
	<211> 53	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	

ES 2 282 599 T3

	<400> 264	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gtctttcttg ccgtgcctgg tca	53
5	<210> 265	
	<211> 44	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
15	<400> 265	
	gatgcaaggt cgcatatgag gaaaccattg aaccagcag aaaa	44
20	<210> 266	
	<211> 55	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
30	<400> 266	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gttgctatac ttgtgtttcc ctacg	55
35	<210> 267	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 267	
45	gatgcaaggt cgcatatgag gttgacctgt tgtgttacca gcaat	45
	<210> 268	
50	<211> 55	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 268	
60	aattctaata cgactcacta tagggagaag gcaccacgga cacacaaagg acaag	55
	<210> 269	
	<211> 42	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 282 599 T3

	<220>		
	<223> Cebador de NASBA para HPV		
5	<400> 269		
	gatgcaaggt cgcatatgag ctgttgacct gttgtgttac ga	42	
10	<210> 270		
	<211> 53		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador de NASBA para HPV		
	<400> 270		
20	aattctaata cgactcacta tagggagaag gccacggaca cacaaggac aag	53	
	<210> 271		
25	<211> 40		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Cebador de NASBA para HPV		
	<400> 271		
35	gatgcaaggt cgcatatgag gttgacctgt tgtgttacga	40	
	<210> 272		
40	<211> 51		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Cebador de NASBA para HPV		
	<400> 272		
50	aattctaata cgactcacta tagggagaag gacggacaca caaaggacaa g	51	
	<210> 273		
	<211> 40		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de NASBA para HPV		
60	<400> 273		
	gatgcaaggt cgcatatgag ggaggaggat gaagtagata	40	
65	<210> 274		
	<211> 51		

ES 2 282 599 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 274	
10	aattctaata cgactcacta tagggagaag ggcccattaa catctgctgt a	51
	<210> 275	
	<211> 43	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 275	
25	gatgcaaggt cgcatatgag agaggaggag gatgaagtag ata	43
	<210> 276	
	<211> 51	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
35	<400> 276	
40	aattctaata cgactcacta tagggagaag gacgggcaaa ccaggcttag t	51
	<210> 277	
	<211> 44	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
50	<400> 277	
55	gatgcaaggt cgcatatgag ttgggtgtgt ggagacaaac atct	44
	<210> 278	
	<211> 55	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
65	<400> 278	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gttcatcctc atcctcatcc tctga	55

ES 2 282 599 T3

	<210> 279	
	<211> 42	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
10	<400> 279	
	gatgcaaggt cgcatatgag tgggggtgctg gagacaaaca tc	42
15	<210> 280	
	<211> 53	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
25	<400> 280	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gcatacctcat cctcactc tc	53
30	<210> 281	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
40	<400> 281	
	gatgcaaggt cgcatatgag tgggggtgct ggagacaaac at	42
45	<210> 282	
	<211> 53	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
55	<400> 282	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gccacaaact tacactcaca aca	53
60	<210> 283	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	

ES 2 282 599 T3

	<400> 283	
	gatgcaaggt cgcatatgag gatttcctt atgcagtgtg	40
5	<210> 284	
	<211> 51	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
15	<400> 284	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag ggacatctgt agcaccttat t	51
20	<210> 285	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
30	<400> 285	
	cgcatgcaac tga yctmyac t gttatgaca tgcg	34
35	<210> 286	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 286	
45	ccgtcgcaac tga yctmyac t gttatgacg acgg	34
	<210> 287	
50	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 287	
60	ccacccaac tga yctmyac t gttatgagg gtgg	34
	<210> 288	
	<211> 34	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 282 599 T3

	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
5	<400> 288	
	cgatcgcaac tgaactmyac tggatgacg atcg	34
10	<210> 289	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 289	
20	ccaagcgaam caactgacct aywtgctat gcttgg	36
	<210> 290	
25	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 290	
35	ccaagccgaa mcaactgacc taywtgcta tggcttgg	38
	<210> 291	
40	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 291	
50	ccaagcggaa mcaactgacc taywtgcta tcgcttgg	38
	<210> 292	
	<211> 36	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
60	<400> 292	
	ccagcgggaam caactgacct aywtgctat cgctgg	36
65	<210> 293	
	<211> 36	

ES 2 282 599 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 293	
10	cgatcggaam caactgacct aywctgctat cgatcg	36
	<210> 294	
	<211> 30	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 294	
25	ccaagcaaga cattattcag actcgcttgg	30
	<210> 295	
	<211> 30	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
35	<400> 295	
40	cgcatgaaga cattattcag actccatgcg	30
	<210> 296	
	<211> 30	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
50	<400> 296	
55	cccagcaaga cattattcag actcgctggg	30
	<210> 297	
	<211> 30	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
65	<400> 297	
	cgatcgaaga cattattcag actccgatcg	30

ES 2 282 599 T3

	<210> 298	
	<211> 40	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
10	<400> 298	
	gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggggtaa	40
15	<210> 299	
	<211> 50	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
25	<400> 299	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcattatcc tccccatgac	50
30	<210> 300	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
40	<400> 300	
	gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggsrhaa	40
45	<210> 301	
	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
55	<400> 301	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcattatcc tmmcatgdc	50
60	<210> 302	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<220>	
	<221> características varias	

ES 2 282 599 T3

	<222> (37)..(37)	
	<223> “n” representa inosina	
	<220>	
5	<221> características varias	
	<222> (38)..(38)	
	<223> “n” representa inosina	
10	<400> 302	
	gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggsnnaa	40
15	<210> 303	
	<211> 40	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<220>	
25	<221> características varias	
	<222> (36)..(36)	
	<223> “n” representa inosina	
	<220>	
30	<221> características varias	
	<222> (37)..(37)	
	<223> “n” representa inosina	
35	<400> 303	
	gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggnhaa	40
40	<210> 304	
	<211> 40	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<220>	
50	<221> características varias	
	<222> (36)..(36)	
	<223> “n” representa inosina	
	<220>	
55	<221> características varias	
	<222> (38)..(38)	
	<223> “n” representa inosina	
60	<400> 304	
	gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggnnaa	40
65	<210> 305	
	<211> 40	

ES 2 282 599 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 305	
10	gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggggtaa	40
	<210> 306	
	<211> 40	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de NASBA para HPV	
	<400> 306	
25	gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggggaaa	40
	<210> 307	
	<211> 40	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
35	<400> 307	
40	gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggcataa	40
	<210> 308	
	<211> 40	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
50	<400> 308	
	gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggggcaa	40
55	<210> 309	
	<211> 40	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
65	<400> 309	
	gatgcaaggt cgcatatgag aatggcattt gttggcacia	40

ES 2 282 599 T3

	<210> 310	
	<211> 50	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
10	<220>	
	<221> características varias	
	<222> (44)..(44)	
	<223> “n” representa inosina	
15	<220>	
	<221> características varias	
	<222> (49)..(49)	
	<223> “n” representa inosina	
20	<400> 310	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcattatcc tcmncattgnc	50
25	<210> 311	
	<211> 50	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
35	<220>	
	<221> características varias	
	<222> (49)..(49)	
	<223> “n” representa inosina	
40	<400> 311	
	aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcattatcc tcaacatgnc	50
45	<210> 312	
	<211> 50	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de NASBA para HPV	
55	<220>	
	<221> características varias	
	<222> (43)..(43)	
	<223> “n” representa inosina	
60	<220>	
	<221> características varias	
	<222> (44)..(44)	
65	<223> “n” representa inosina	

ES 2 282 599 T3

<400> 312

aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcattatcc tcnncatgac

50

5

<210> 313

<211> 50

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de NASBA para HPV

<220>

15

<221> características varias

<222> (43)..(43)

<223> "n" representa inosina

20

<220>

<221> características varias

<222> (44)..(44)

<223> "n" representa inosina

25

<400> 313

aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcattatcc tcnncatggc

50

30

<210> 314

<211> 50

<212> ADN

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de NASBA para HPV

<220>

40

<221> características varias

<222> (43)..(43)

<223> "n" representa inosina

45

<220>

<221> características varias

<222> (44)..(44)

<223> "n" representa inosina

50

<400> 314

aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcattatcc tcnncatgac

50

55

<210> 315

<211> 50

<212> ADN

60

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de NASBA para HPV

<220>

65

<221> características varias

<222> (43)..(43)

ES 2 282 599 T3

	<223> “n” representa inosina	
	<220>	
	<221> características varias	
5	<222> (44)..(44)	
	<223> “n” representa inosina	
	<400> 315	
10	aattctaata cgactcacta tagggagaag gtcatatcc tenncatgcc	50
	<210> 316	
15	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador	
	<400> 316	
25	tacactgctg gacaacat	18
	<210> 317	
	<211> 18	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador	
	<400> 317	
40	tcattctctg agctgtct	18
	<210> 318	
	<211> 21	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 318	
	tcaaaagcca ctgtgtcctg a	21
55	<210> 319	
	<211> 21	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
65		

ES 2 282 599 T3

	<400> 319	
	cgtgttcttg atgatctgca a	21
5	<210> 320	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
15	<400> 320	
	ttccggttga ccttctatgt	20
20	<210> 321	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador	
30	<400> 321	
	ggtcgtctgc tgagctttct	20
	<210> 322	
35	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 322	
45	ctacagtaag cattgtgcta tgc	23
	<210> 323	
50	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador	
	<400> 323	
60	acgtaatgga gaggttgcaa taaccc	26
	<210> 324	
	<211> 21	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 282 599 T3

	<220>		
	<223> Cebador		
5	<400> 324		
	aacgccatga gaggacacaa g		21
10	<210> 325		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 325		
20	acacataaac gaactgtggt g		21
	<210> 326		
25	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Cebador		
	<400> 326		
35	cccgaggcaa ctgacctata		20
	<210> 327		
40	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Cebador		
	<400> 327		
50	ggggcacact attccaaatg		20
	<210> 328		
	<211> 21		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
60	<400> 328		
	gcagacgacc actacagcaa a		21
65	<210> 329		
	<211> 19		

ES 2 282 599 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador	
	<400> 329	
10	acaccgagtc cgagtaata	19
	<210> 330	
	<211> 24	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador	
	<400> 330	
25	gaaaccattg aaccagcag aaaa	24
	<210> 331	
	<211> 24	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
35	<400> 331	
40	ttgctatact tgtgttccc tacg	24
	<210> 332	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 332	
	ggaggaggat gaagtagata	20
55	<210> 333	
	<211> 20	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
65	<400> 333	
	gcccattaac atctgetgta	20

ES 2 282 599 T3

	<210> 334	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
10	<400> 334	
	gtgcctacgc ttttatcta	20
15	<210> 335	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
25	<400> 335	
	ggggtctcca acactctgaa ca	22
30	<210> 336	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 336	
40	tcaggcgttg gagacatc	18
45	<210> 337	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 337	
55	agcaatcgta agcacact	18
	<210> 338	
60	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Cebador	

ES 2 282 599 T3

	<400> 338	
	ttgttactg tggtagatac tac	23
5	<210> 339	
	<211> 25	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
15	<400> 339	
	gaaaaataaa ctgtaaatca tattc	25
20	<210> 340	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador	
30	<400> 340	
	acacaactgt gttcactagc	20
	<210> 341	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 341	
45	gaaaccaag agtcttctct	20
	<210> 342	
50	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 342	
60	cgatcggtag cgagggcagt gtaatacgat cg	32
	<210> 343	
	<211> 32	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 282 599 T3

	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
5	<400> 343	
	cgatcgggtgc ctacgctttt tatctacgat cg	32
10	<210> 344	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 344	
20	ccgtcgttgc agcgatctga ggtatatgcg acgg	34
	<210> 345	
25	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Sonda molecular fluorescente para HPV	
	<400> 345	
35	cgatcgtggc agtggaaaagc agtggagaca cgatcg	36
40		
45		
50		
55		
60		
65		