



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 281 077**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96109054 .5**

86 Fecha de presentación : **05.06.1996**

87 Número de publicación de la solicitud: **0747489**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.12.1996**

54

Título: **Sondas de ácidos nucleicos y oligonucleótidos de amplificación para detectar especies de *Neisseria*.**

30

Prioridad: **07.06.1995 US 475460**
07.06.1995 US 483715
07.06.1995 US 484607

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

73

Titular/es: **GEN-PROBE INCORPORATED**
10210 Genetic Center Drive
San Diego, California 92121, US

72

Inventor/es: **Yang, Yeasing;**
Bee, Gary y
McDonough, Sherrol

74

Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 281 077 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sondas de ácidos nucleicos y oligonucleótidos de amplificación para detectar especies de *Neisseria*.

5 **Ámbito de la invención**

Las invenciones descritas y reivindicadas en la presente se refieren al diseño y empleo de oligonucleótidos de amplificación y sondas de ácido nucleico para la *Neisseria gonorrhoeae*, que permitan la detección de este organismo en las muestras de ensayo.

10

Antecedentes de la invención

El género *Neisseria* comprende dos especies gram-negativas de cocos piogénicos que son patogénicos para el hombre, y que no tienen ningún otro reservorio conocido: el meningococcus (*Neisseria meningitidis*) y el gonococcus (*Neisseria gonorrhoeae*). Un número de especies no patogénicas habitan también el tracto respiratorio superior de los humanos y pueden fácilmente confundirse con los meningococci. La meningitis meningocócica fue reconocida como una enfermedad contagiosa tempranamente en el siglo 19 y es especialmente frecuente entre el personal militar. El agente causante de la meningitis meningocócica es la *Neisseria meningitidis*.

15

20

La *Neisseria gonorrhoeae* es una de las principales causas de enfermedad epidémica sexualmente transmitida, y es frecuente en los Estados Unidos. La infección con *Neisseria gonorrhoeae* ocasiona muchos síntomas corrientes que incluyen la uretritis, cervicitis y proctitis. Además, la infección crónica con *Neisseria gonorrhoeae* puede ocasionar la enfermedad inflamatoria pélvica.

25

Las *Neisserias* son cocos gram-negativos que crecen en parejas y ocasionalmente en tétradas o racimos. Muchos meningococos tienen cápsulas que contienen polisacáridos. Los gonococos pueden poseer también cápsulas, pero la exacta composición química de dicha cápsula es desconocida. Además, tanto los gonococos como los meningococos pueden tener filamentos, los cuales juegan un papel en la virulencia.

30

Los meningococos y gonococos son difíciles de cultivar y se necesitan técnicas especiales para hacer crecer los organismos de los fluidos corporales. Además, se necesita un medio de cultivo selectivo (por ejemplo, el medio Thayer-Martin), debe cultivarse en una atmósfera con el 3-10% de dióxido de carbono y aproximadamente a 35°C, para maximizar el cultivo de los organismos.

35

Además del cultivo difícil, la detección del gonococo y el meningococo por medio de un inmunoensayo, adolece de falta de sensibilidad y especificidad. Esto parece ser debido a la reacción cruzada que se produce entre varios otros microorganismos patógenos y no-patogénicos encontrados a menudo en el mismo espécimen clínico.

40

Los oligonucleótidos para la amplificación del ácido nucleico para la detección de la *Neisseria* han sido descritos. Bikenmeyer y Armstrong, *J. Clin. Microbiol.* 30:3089-3094 (1992), describen juegos de sondas para emplear en la reacción en cadena de la ligasa dirigida a los genes Opa y pilin de *Neisseria gonorrhoeae*. Kristiansen *et al.*, *Lancet* 340:1432-1434 (1992) describen cebadores dirigidos a un elemento de inserción designado como IS1106 para la amplificación y detección de *Neisseria meningitidis*. McLaughlin *et al.*, *Mol. and Cell Probes* 7:7-17 (1993) describe cebadores para emplear en la reacción en cadena de la polimerasa dirigidos al espaciador transcrito internamente del ARNr de 16S-23S, y un juego de cebadores dirigidos a una subregión del ARNr de 16S de *Neisseria meningitidis*. Sondas para la detección de secuencias de ARNr ó ADNr de *Neisseria gonorrhoeae* y/o *Neisseria meningitidis* han sido descritos por Granato y Franz *J. Clin. Microbiol.* 28:944-948, (1990), Wolf, patente U.S. 5.173.401 (22 Dic. 1992), Rossau y Van Heuverswijn, publicación de la solicitud de patente europea nº 0 337 896, Hogan *et al.*, PCT/US87/03009, y Barns *et al.*, U.S. patente 5.217.862 (8 Junio 1993). La patente EP 318245 describe sondas que tienen como objetivo regiones particulares del ácido nucleico ribosómico de 16S de la *Neisseria gonorrhoeae*. La patente EP 552931 describe el empleo de ácidos nucleicos ramificados para la detección de ARN ribosómico de la *Neisseria gonorrhoeae*. La patente WO 90/14442 describe sondas para la unión al ácido nucleico ribosómico de 16S y 23S, de la *Neisseria gonorrhoeae*.

45

50

55 **Resumen de la invención**

La invención de referencia describe y reivindica nuevos y útiles juegos de oligonucleótidos de amplificación, de acuerdo con las reivindicaciones 1-16, un kit que comprende oligonucleótidos auxiliares, y sondas para ensayos de hibridación de oligonucleótidos, de acuerdo con las reivindicaciones 17-31, los cuales oligonucleótidos y sondas están diseñados para ser complementarios con las regiones específicas del ARNr (ARN ribosómico) ó ADNr (ADN ribosómico) secuencias de nucleótidos de *Neisseria gonorrhoeae* u oligonucleótidos que tienen una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una porción específica del RNAr de *Neisseria gonorrhoeae*, o la secuencia de nucleótidos del ADNr o su complemento. Debido a estos oligonucleótidos de amplificación, se derivan oligonucleótidos auxiliares y sondas para ensayo de hibridación, a partir del ARNr de *Neisseria gonorrhoeae* patogénica, se obtiene un ensayo de detección superior debido al nivel más alto de ARN expresado a partir de esos genes de ARNr y a la falta de transferencia lateral de las secuencias de ARNr entre organismos.

65

Los oligonucleótidos de amplificación y las sondas para ensayo de hibridación de oligonucleótidos funcionan mediante la hibridación a las secuencias génicas diana del ARNr y/o ADNr de 16S y 23S de la *Neisseria gonorrhoeae* en condiciones restrictivas del ensayo de hibridación. En versiones preferidas, las sondas y los oligonucleótidos de amplificación descritos en la presente, cuando se emplean juntos, pueden distinguir la *Neisseria gonorrhoeae* de otros microorganismos encontrados en muestras clínicas tales como sangre o tejidos. En consecuencia, los oligonucleótidos de amplificación y las sondas para ensayo de hibridación pueden emplearse en un ensayo para detectar específicamente y/o amplificar los ácidos nucleicos derivados de la *Neisseria gonorrhoeae*. En versiones preferidas, las sondas para ensayo de hibridación descritas en la presente son capaces de hibridar selectivamente con ácidos nucleicos de la *Neisseria gonorrhoeae* y no con los derivados de la *Neisseria meningitidis* en condiciones restrictivas de hibridación. En algunas versiones de la presente invención, la sonda para ensayo de hibridación comprende un oligonucleótido que contiene un grupo informador tal como un éster de acridinio o un radioisótopo para ayudar a la hibridación de identificación de la sonda con su secuencia diana. En algunas versiones de la presente invención el oligonucleótido de amplificación tiene opcionalmente una secuencia de ácido nucleico reconocida por una ARN polimerasa, o que potencia la iniciación de la transcripción, mediante una ARN polimerasa.

La presente invención se refiere también a sondas para ensayo de hibridación, útiles para la detección de los ácidos nucleicos de la *Neisseria gonorrhoeae*. De preferencia, estas sondas para los ensayos de hibridación tienen una secuencia de nucleótidos seleccionada de una de las siguientes secuencias de nucleótidos:

SEQ ID NO 3: GCCAATATCG GCGGCCGATG

SEQ ID NO 30: CATCGGCCGC CGATATTGGC

SEQ ID NO 32: GCCAAUAUCG GCGGCCGAUG

SEQ ID NO 34: CAUCGGCCGC CGAUAUUGGC

De preferencia, los oligonucleótidos auxiliares se emplean para facilitar la hibridación específica de la sonda de ensayo con su ácido nucleico diana; los oligonucleótidos auxiliares están descritos por Hogan y Milliman en la patente U.S. nº 5.030.557. Los oligonucleótidos empleados como sondas auxiliares en esta invención incluyen las siguientes secuencias:

SEQ ID NO: 4 ACGGTACCTG AAGAATAAGC ACCGGCTAAC TACGTG

SEQ ID NO: 40 ACGGUACCUAG AAGAAUAAGC ACCGGCUAAC UACGUG

Otro aspecto de la presente invención comprende las composiciones de acuerdo con las reivindicaciones 32-33, para la detección de la *Neisseria gonorrhoeae* que son híbridos de ácido nucleico formados entre un oligonucleótido de la presente invención y una región específica de un polímero nucleótido de una *Neisseria gonorrhoeae*. Generalmente el polímero de nucleótidos contiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una secuencia de oligonucleótidos de la presente invención o su complemento y se deriva del ARNr ó el ADNr que codifica el ARN ribosómico de la *Neisseria gonorrhoeae*. Los oligonucleótidos presentes en estas composiciones pueden ser el juego de oligonucleótidos de amplificación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y dicha sonda del ensayo de hibridación de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28. Estas composiciones podrían comprender además un oligonucleótido auxiliar de una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31.

Las composiciones de la presente invención que contienen una sonda hibridada con su secuencia diana son útiles para la detección de la presencia de una secuencia de ácido nucleico. Las composiciones de la presente invención que contienen un oligonucleótido auxiliar hibridado con su secuencia de ácido nucleico diana, son de utilidad para construir una porción particular del ácido nucleico diana capaz para la hibridación. Las composiciones de la presente invención que contienen un cebador oligonucleótido hibridado con su secuencia diana, son útiles para la creación de un sitio de iniciación para una polimerasa en el extremo 3' del cebador, y/o la provisión de un molde para la extensión del extremo 3' de la secuencia diana.

La presente invención contempla además, métodos para la detección de la presencia de la *Neisseria gonorrhoeae* de acuerdo con las reivindicaciones 34-37. En estos métodos, una muestra de ensayo se pone en contacto con una sonda para ensayos de hibridación de ácido nucleico, en condiciones de ensayo de hibridación restrictivas, en donde la sonda para ensayos de hibridación del ácido nucleico es capaz de hibridar con las secuencias de ácido nucleico diana de la *Neisseria gonorrhoeae*, y no con las secuencias de ácido nucleico de la *Neisseria meningitidis*. La presente invención contempla también los oligonucleótidos y los equivalentes de los mismos empleados en estos métodos que opcionalmente contienen una molécula informadora que ayuda a la identificación de la hibridación de la sonda con su secuencia diana. Esta invención es útil para la detección de la presencia de los ácidos nucleicos de la *Neisseria gonorrhoeae* en las muestras de ensayo de humanos, tales como sangre, muestras derivadas de la sangre, tejidos, muestras derivadas de tejidos, otros fluidos corporales y muestras corporales.

ES 2 281 077 T3

La presente invención comprende también métodos para la detección de la presencia de la *Neisseria gonorrhoeae* en la cual el ácido nucleico se amplifica empleando por lo menos un oligonucleótido de amplificación de la presente invención. En versiones preferidas, dicha amplificación es seguida a continuación por un paso de detección en el cual el ácido nucleico amplificado se detecta empleando una sonda para ensayo de hibridación de oligonucleótidos de la presente invención. Los métodos de la presente invención comprenden también el empleo de oligonucleótidos de amplificación que incluyen la secuencia de nucleótidos para un promotor de ARN.

En otro aspecto, la invención se refiere a oligonucleótidos de amplificación útiles para la detección de organismos de la especie *Neisseria gonorrhoeae* por medio de un ensayo de amplificación. Estos oligómeros de preferencia, corresponden substancialmente a una de las siguientes secuencias de nucleótidos:

SEQ ID NO: 7 GCTGCTGCAC GTAGTTAGCC GGTGCTTATT CTTCAG

SEQ ID NO: 9 CGGGTTGTAA AGGACTTTTG TCAGGGAAGA AAAGGCCGTT

SEQ ID NO: 45 CGGUUGUAA AGGACUUUUG UCAGGGAAGA AAAGCCGUU

Y

SEC ID NO: 43 GCUGCUGCAC GUAGUUAGCC GGUGCUUAUJ CUUCAG

en donde el oligómero puede estar sin modificar o contiene una modificación tal como la adición de una secuencia de ácido nucleico específico en el terminal 5' que es reconocida mediante una ARN polimerasa, (incluyendo pero sin limitarlo a la secuencia promotora para la T7, T3 ó SP6 ARN polimerasa), y/o secuencias que potencian la iniciación de la transcripción del ARN mediante una ARN polimerasa. Un ejemplo de una secuencia promotora incluye la secuencia SEQ ID NO: 53 5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3'. Otros ejemplos de secuencias promotoras útiles están contenidas en varios vectores comercialmente disponibles incluyendo por ejemplo los vectores pBluescript® de Stratagene Cloning Systems (San Diego, CA) ó los vectores pGEM® de Promega Corp. (Madison, WI).

En otro aspecto de la presente invención, los nucleótidos de amplificación se unen a, o causan un alargamiento a través de las secuencias que substancialmente corresponden a las siguientes secuencias:

SEQ ID NO: 19 CTGAAGAATA AGCACCGGCT AACTACGTGC AGCAGC

SEQ ID NO: 20 AACGGCCTTT TCTTCCCTGA CAAAAGTCCT TTACAACCCG

SEQ ID NO: 49 CUGAAGAAUA AGCACCGGCU AACUACGUGC AGCAGC

SEQ ID NO: 51 AACGGCCUUU UCUUCCUGA CAAAAGUCCU UUACAACCCG

Otro aspecto de la presente invención incluye kits de acuerdo con las reivindicaciones 16-31, que contienen uno o más de los oligonucleótidos de la presente invención incluyendo los oligonucleótidos de amplificación, los oligonucleótidos auxiliares y las sondas del ensayo de hibridación. En versiones preferidas, un kit de la presente invención incluye por lo menos un oligonucleótido de amplificación y una sonda de ensayo de hibridación capaz de distinguir la *Neisseria gonorrhoeae* de otros microorganismos.

Descripciones antecedentes del empleo de la hibridación de ácido nucleico para detectar secuencias de ácido nucleico particulares, vienen dadas en Kohne, U.S. patente nº 4.851.330 publicada el 25 Julio 1989 y por Hogan *et al.*, solicitud de patente internacional nº PCT/US87/03009 titulada "Nucleic Acid Probes for Detection and/or Quantitation of Non-Viral Organisms" ("Sondas de ácido nucleico para la detección y/o cuantificación de organismos no víricos"). Hogan *et al.*, *supra*, describen métodos para la determinación de la presencia de un organismo no vírico o un grupo de organismos no víricos en una muestra (p. ej., un esputo, orina, sangre y secciones de tejidos, alimentos, suelo y agua).

En las versiones más preferidas, las composiciones, sondas, cebadores de amplificación, oligonucleótidos auxiliares y similares tienen una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia de ácido nucleico especificada, más bien que los substancialmente correspondientes a la secuencia de ácido nucleico. Estas versiones más preferidas emplean las secuencias referidas en las reivindicaciones y relacionadas en el listado de secuencias que forma parte de la presente descripción.

Descripción detallada de la invención

A. Definiciones

5 Los siguientes términos tienen los significados indicados en la especificación a no ser que expresamente se indique un significado distinto.

Por “ácido nucleico diana” se entiende un ácido nucleico que tiene una secuencia diana de nucleótidos.

10 Por “oligonucleótido” se entiende un polímero de nucleótidos monocatenarios construido con más de 2 subunidades de nucleótido covalentemente unidas entre sí. De preferencia, se encuentran presentes entre 10 y 100 unidades de nucleótido, y con más preferencia entre 12 y 50 unidades de nucleótido están unidas entre sí. Los grupos azúcar de las subunidades de nucleótido pueden ser ribosa, desoxirribosa o derivados modificados de los mismos tales como la 2'-O-metil ribosa. Las subunidades nucleótido de un oligonucleótido pueden unirse mediante uniones fosfodiéster, uniones fosforotioato, uniones metil fosfonato o mediante otras uniones raras o que no se encuentran en la naturaleza, que no impiden la hibridación del oligonucleótido. Además, un oligonucleótido puede tener nucleótidos no comunes o grupos de no nucleótidos. Un oligonucleótido como se ha definido en la presente es un ácido nucleico, preferiblemente de ADN pero puede ser de ARN ó tener una combinación de ribo- y desoxirribonucleótidos covalentemente unidos. Las sondas de oligonucleótidos y oligonucleótidos de amplificación de una secuencia definida pueden obtenerse por técnicas ya conocidas por los expertos en la especialidad, como por ejemplo, mediante síntesis química o bioquímica, y mediante la expresión *in vitro* o *in vivo* de moléculas de ácido nucleico recombinantes, p. ej., vectores bacterianos o retrovíricos. Como se ha pretendido en esta descripción, un oligonucleótido no consiste en un ADN cromosómico de tipo salvaje ó la transcripción *in vivo* de productos del mismo. Un empleo de una sonda es como sonda para ensayos de hibridación; las sondas pueden emplearse también como oligómeros terapéuticos de amplificación *in vivo* o *in vitro*, o agentes antisentido para bloquear o inhibir la transcripción de genes, o la traducción en células enfermas, infectadas o patogénicas.

20 Por “secuencia diana de ácidos nucleicos” “secuencia de nucleótidos diana” ó “secuencia diana” se entiende una secuencia específica de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, la cual comprende toda o parte de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico monocatenario, y la secuencia complementaria de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos del mismo.

30 La hibridación del ácido nucleico es el proceso mediante el cual dos cadenas de ácido nucleico que tienen completa o parcialmente las secuencias de nucleótidos complementarias, se encuentran juntamente en determinadas condiciones de reacción para formar un híbrido estable de doble cadena con puentes específicos de hidrógeno. O bien la cadena de ácido nucleico puede ser un ácido desoxirribonucleico (ADN) ó un ácido ribonucleico (ARN) o un análogo de uno de estos ácidos nucleicos; así, la hibridación puede implicar híbridos ARN:ARN, híbridos ADN:ADN, ó híbridos ARN:ADN.

40 El término “hibridación” como se emplea en esta solicitud, se refiere a la capacidad de dos cadenas simples de ácido nucleico completa o parcialmente complementarias, de encontrarse juntamente entre sí en una orientación antiparalela para formar una estructura estable que tiene una región de doble cadena. Las dos cadenas constituyentes de esta estructura bicatenaria, a veces llamada un híbrido, se sostienen entre sí mediante puentes de hidrógeno. Aunque estos puentes de hidrógeno se forman más corrientemente entre nucleótidos que contienen las bases adenina y timina o uracilo (A y T ó U) ó citosina y guanina (C y G) sobre cadenas simples de ácido nucleico, se pueden formar pares de bases entre bases que no son miembros de estos pares “canónicos”. Pares de base no-canónicos son bien conocidos en la especialidad. Ver p. ej., *The Biochemistry of the Nucleic Acids* (“Bioquímica de los ácidos nucleicos”) (Adams *et al.*, eds., 1992).

50 Condiciones “restrictivas” del ensayo de hibridación quiere decir condiciones en donde una sonda específica del ensayo de hibridación es capaz de hibridar con ácidos nucleicos diana (de preferencia ARNr ó ADNr de una *Neisseria gonorrhoeae*) de preferencia a otros ácidos nucleicos presentes en la muestra del ensayo, derivados bien sea de otros microorganismos o de humanos. Debe tenerse en cuenta que estas condiciones pueden variar en función de factores que incluyen el contenido de GC y la longitud de la sonda, la temperatura de hibridación, la composición del reactivo o solución de hibridación y el grado de especificidad de hibridación buscado. Las condiciones restrictivas específicas de hibridación se describen más adelante.

60 Como ejemplo de condiciones restrictivas específicas de hibridación útiles en la detección de la *Neisseria gonorrhoeae* para las sondas del ensayo de hibridación de esta invención, se empleó un conjunto de condiciones restrictivas preferidas del ensayo de hibridación. Un conjunto preferido comprende la hibridación del ácido nucleico diana y la sonda de hibridación juntos en 100 μ l de succinato de litio 0,5 M (pH 5,0) LiCl 6 M, 1% (p/v) de lauril sulfato de litio, (L.L.S.) 10 mM de ácido etilen diamina tetracético (EDTA), 10 mM de etilenglicol bis (beta-amino etil éter), ácido N,N, N',N'-tetracético (EGTA) a 60°C durante 15 minutos, a continuación añadiendo 300 μ l de tetraborato de sodio 0,15 M (pH 8,5), 1% (v/v) de TRITON® X-100 a 60°C durante 5-7 minutos. Pueden determinarse otros conjuntos de condiciones restrictivas de hibridación adicionales después de la lectura de la presente descripción por los normalmente expertos en la técnica.

Por “sonda” se entiende un oligonucleótido monocatenario que tiene una secuencia parcial o completamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que se busca para ser detectada, de forma que se hibrida a la misma en condiciones restrictivas de hibridación. El término “sonda” se entiende que excluye los ácidos nucleicos que existen normalmente en la naturaleza. Las sondas de oligonucleótidos purificadas pueden obtenerse mediante técnicas ya conocidas en la especialidad tales como síntesis química y mediante la expresión *in vitro* o *in vivo* de moléculas recombinantes de ácido nucleico, *p. ej.*, vectores retrovíricos. De preferencia, las sondas tienen de 10 a 100 nucleótidos de longitud. Las sondas pueden tener o no, regiones que no son complementarias con una secuencia diana, siempre que dichas secuencias no afecten substancialmente la hibridación en las condiciones restrictivas de hibridación. Si dichas regiones existen, pueden contener una secuencia promotora 5' y/o un sitio de unión para la transcripción de ARN, un sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción, o pueden contener secuencias que pueden conferir una estructura secundaria o terciaria deseada, tales como un sitio catalítico activo o una estructura de horquilla de cabello sobre la sonda, sobre el ácido nucleico diana o ambos. Una sonda puede marcarse con un grupo informador como *p. ej.*, un radioisótopo, un grupo fluorescente o quimioluminiscente, con una enzima o ligando, el cual puede emplearse para la detección o confirmación de que la sonda ha hibridado con la secuencia diana.

Como se emplea en esta descripción, la frase “una sonda (o un oligonucleótido) que tenga una secuencia de ácido nucleico consistiendo esencialmente en una secuencia seleccionada de” un grupo de secuencias específicas significa que la sonda, como una característica básica y nueva, es capaz de hibridar establemente con un ácido nucleico que tiene el complemento exacto de una de las secuencias listadas del grupo del ácido nucleico, en condiciones restrictivas de hibridación. Un complemento exacto incluye la correspondiente secuencia de ADN ó ARN.

La frase “substancialmente correspondiente a una secuencia de ácido nucleico” significa que el ácido nucleico al que se refiere, es suficientemente similar a la secuencia de ácido nucleico para que el ácido nucleico de referencia tenga unas propiedades similares de hibridación con la secuencia de ácido nucleico en el que hibridaría con la misma secuencia de ácido nucleico diana en condiciones restrictivas de hibridación.

Un experto en la técnica comprenderá que las sondas y cebadores de la invención substancialmente correspondientes, pueden variar con referencia a la secuencia y todavía hibridar con la misma secuencia de ácido nucleico diana. Esta variación del ácido nucleico puede establecerse en términos de un porcentaje de bases idénticas dentro de la secuencia o el porcentaje de bases perfectamente complementarias entre la sonda o el cebador y su secuencia diana. Un experto en la técnica comprenderá también que esta variación podría ser expresada como el número de bases en una sonda o cebador o el número de bases desajustadas de una sonda que no hibrida con la base correspondiente de una secuencia del ácido nucleico diana. Las sondas o cebadores de la presente invención corresponden substancialmente a una secuencia de ácido nucleico si estos porcentajes son del 100% al 80% ó de 0 desajustes de bases en una secuencia diana de 10 nucleótidos a 2 desajustes de bases en una secuencia diana de 10 nucleótidos.

En versiones preferidas, el porcentaje es del 100% al 85%. En versiones más preferidas, este porcentaje es del 90% al 100%; y en otras versiones preferidas, este porcentaje es del 95% al 100%. Un experto en la especialidad comprenderá las varias modificaciones a las condiciones de hibridación que puede ser necesario introducir en porcentajes varios de complementariedad, para lograr la hibridación con una secuencia diana específica sin causar un inaceptable nivel de hibridación no específica.

Por “híbrido de ácido nucleico” o “híbrido” se entiende una estructura de ácido nucleico que contiene una región de doble cadena unida con hidrógeno, de preferencia entre 10 y 100 nucleótidos de longitud, con la mayor preferencia entre aproximadamente 12 y 50 nucleótidos de longitud, en donde cada cadena es complementaria a la otra y en donde la región es suficientemente estable en las condiciones restrictivas de hibridación, para ser detectada por medios que incluyen pero no están limitados a la detección por luz de quimioluminiscencia o fluorescencia, autorradiografía, o electroforesis sobre gel. Estos híbridos pueden comprender moléculas dúplex ARN:ARN, ARN:ADN, ó ADN:ADN o moléculas dúplex que contienen análogos de estos ácidos nucleicos.

Por “complementario” se entiende que las secuencias de nucleótidos de regiones similares de dos ácidos nucleicos monocatenarios, o dos diferentes regiones del mismo ácido nucleico monocatenario tienen una composición de bases nucleótidas que permite que las cadenas simples hibriden juntamente en una región estable de doble cadena unidas por hidrógenos en condiciones restrictivas de hibridación. Cuando una secuencia contigua de nucleótidos de una región monocatenaria es capaz de formar una serie de pares de bases canónicas unidas por hidrógenos, con una secuencia análoga de nucleótidos de la otra región monocatenaria de manera que A se empareja con U ó T y C se empareja con G, las secuencias de nucleótidos son “perfectamente” complementarias.

Por “variantes conservadoramente modificadas” se entienden ácidos nucleicos u oligonucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos que es complementaria con una región de ácido nucleico de otro ácido nucleico, siendo a su vez dicha región perfectamente complementaria con un ácido nucleico de referencia. Estas variantes conservadoramente modificadas son capaces de hibridar establemente con una región diana de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la *Neisseria gonorrhoeae* en condiciones restrictivas de hibridación.

Por “oligonucleótido de amplificación” se entiende un oligonucleótido capaz de hibridar con una secuencia diana de ácido nucleico y actuar como cebador para la síntesis de ácido nucleico o como molde promotor (*p. ej.*, para la síntesis de una cadena complementaria, formando con ello una secuencia promotora funcional), o ambos, para la iniciación de la síntesis del ácido nucleico. Si el oligonucleótido de amplificación se diseña para iniciar la síntesis del ARN, el

oligonucleótido puede contener secuencias de nucleótidos que son no-complementarias respecto a la secuencia diana, pero son reconocidas por una ARN-polimerasa (tal como T7, T3 y SP6 ARN polimerasa). Un oligonucleótido de amplificación puede tener o no, un termino 3' que se modifica para evitar o disminuir la cantidad de extensión del cebador. Un oligonucleótido de amplificación como se ha definido en la presente tendrá de preferencia entre 10 y 100 nucleótidos de longitud, con más preferencia, entre aproximadamente 12 y 50 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos de amplificación de la presente invención son químicamente sintetizados o derivados de un vector, cuando dichos oligonucleótidos son ácidos nucleicos que no se encuentran en la naturaleza.

Por "amplificación del ácido nucleico" o "amplificación diana" se entiende el aumento del número de moléculas de ácido nucleico que tienen por lo menos una secuencia del ácido nucleico diana.

Por "antisentido" o "sentido negativo" se entiende que tiene una secuencia nucleica complementaria a la de una secuencia de ácido nucleico de referencia.

Por "sentido", "mismo sentido" ó "sentido positivo" se entiende que tiene una secuencia de ácido nucleico análoga a la de una secuencia de ácidos nucleicos de referencia.

Por "oligonucleótido auxiliar" se entiende una sonda de ácido nucleico diseñada para hibridar con el ácido nucleico diana en diferentes locus que los de una sonda marcada, con lo cual aumenta la velocidad de hibridación de la sonda marcada, aumenta la temperatura de fusión (T_m) del híbrido diana:sonda marcada, o ambas.

"Intimamente filogenéticamente relacionado" significa que los organismos están estrechamente relacionados entre sí en un sentido evolutivo y por lo tanto tendrían una mayor homología total de la secuencia de ácido nucleico, que los organismos que están más lejanamente relacionados. Los organismos que ocupan posiciones adyacentes y posiciones próximas a las adyacentes en el árbol filogenético están estrechamente relacionados. Los organismos que ocupan posiciones más lejanas que las adyacentes o próximas a las posiciones adyacentes en el árbol filogenético estarán todavía estrechamente relacionadas si tienen una significativa homología de la secuencia total del ácido nucleico.

B. Condiciones de hibridación y diseño de una sonda/cebador

Las condiciones de la reacción de hibridación, con mayor importancia la temperatura de hibridación y la concentración de sal en la solución de hibridación, pueden seleccionarse para permitir que los oligonucleótidos de amplificación o las sondas de hibridación de la presente invención hibriden de preferencia con los ácidos nucleicos que tienen una secuencia diana de nucleótidos de *Neisseria gonorrhoeae*, y no con otros ácidos nucleicos no diana que se sospecha están presentes en la muestra de ensayo. A concentraciones decrecientes de sal y/o temperaturas crecientes (a saber, una restrictividad creciente) la extensión de la hibridación del ácido nucleico disminuye a medida que los puentes de hidrógeno entre bases de nucleótidos aparejadas en la molécula híbrida de doble cadena, se rompen; este proceso recibe el nombre de "fusión".

Hablando en general, los híbridos más estables son aquellos que tienen el mayor número de contiguos perfectamente emparejados (es decir, pares de bases de nucleótidos unidas por puentes de hidrógenos). Así, cabría esperar normalmente que dichos híbridos fueran los últimos en fundir cuando la restrictividad de las condiciones de hibridación aumente. Sin embargo, una región de ácido nucleico de doble cadena que contenga un par o más de bases desaparejadas, "no canónicas", o imperfectas (dando como resultado un par de bases débil o no existente en aquella posición en la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico) puede ser todavía lo suficientemente estable en las condiciones de una restrictividad relativamente alta, para permitir que el híbrido de ácido nucleico sea detectado en un ensayo de hibridación sin reacción cruzada con otros ácidos nucleicos no seleccionados, presentes en la muestra de ensayo.

Por lo tanto, en función del grado de similaridad entre las secuencias de nucleótidos del ácido nucleico diana y aquellos ácidos nucleicos no diana pertenecientes al organismo filogenéticamente diferente, pero estrechamente relacionado, por un lado, y el grado de complementariedad entre las secuencias de nucleótidos de un particular oligonucleótido de amplificación o sonda de hibridación y aquellos ácidos nucleico diana y no-diana por otro lado, uno o más desaparejamientos no estorban necesariamente la capacidad del oligonucleótido de hibridar con dicho ácido nucleico y no con los ácidos nucleicos no-diana.

Las sondas para ensayo de hibridación de la presente invención fueron escogidas, seleccionadas y/o diseñadas para maximizar la diferencia entre las temperaturas de fusión del híbrido sonda:diana (T_m , definida como la temperatura a la cual la mitad de las moléculas potencialmente de doble cadena en una mezcla de reacción dada, están en un estado desnaturalizado monocatenario), y la T_m de un híbrido desaparejado formado entre la sonda y el ARNr ó ADNr del organismo filogenéticamente más estrechamente relacionado, que se esperaba estuviera presente en la muestra de ensayo, pero que no era buscado para su detección.

Mientras los oligonucleótidos de amplificación no marcados y los oligonucleótidos auxiliares no necesitan tener este extremadamente alto grado de especificidad, como es el caso de la sonda de ensayo de hibridación marcada para ser útil en la presente invención, son diseñados de manera similar para hibridar de preferencia con uno o más ácidos nucleicos diana más que con otros ácidos nucleicos.

Se diseñaron sondas específicas para la *Neisseria meningitidis*, empleando secuencias determinadas en áreas prospectivas diana empleando cebadores complementarios a los ARNr de 16S de cepas de *Neisseria* incluyendo la *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC n° 19424), *Neisseria meningitidis* serogrupo A (ATCC n° 13077), serogrupo C (ATCC n° 23248) y serogrupo L (ATCC n° 43828), aislados clínicos de *Neisseria meningitidis*, *Neisseria lactamica* (ATCC NO. 29193), *Neisseria cinerea* (ATCC NO. 14685), *Neisseria mucosa* (ATCC NO. 19696, *Neisseria sicca* (ATCC NO. 29193) y *Kingella kingae* (ATCC No. 23330). La secuencia de ácido nucleico de vecinos filogenéticamente próximos, incluyendo la secuencia publicada de *Neisseria gonorrhoeae* NCTC 8375, Rossau *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 16:6227 se emplearon también como comparaciones con las secuencias de ácido nucleico de *Neisseria meningitidis* para determinar las regiones variables.

Para facilitar la identificación de las secuencias de ácido nucleico para emplear como sondas y oligonucleótidos de amplificación, las secuencias de nucleótidos de diferentes especies de organismos fueron alineadas en primer lugar para maximizar la homología. Dentro de la molécula de ARNr existe una estrecha relación entre la estructura global y la función. Esto impone restricciones sobre los cambios evolutivos en la secuencia primaria de manera que la estructura secundaria se mantiene. Por ejemplo, si se cambia una base en un lado de la hélice, puede producirse evolutivamente un cambio compensatorio en el otro lado para preservar la complementariedad (lo cual recibe el nombre de co-variancia). Esto permite que dos secuencias muy diferentes se alineen empleando la secuencia primaria conservada y también los elementos de la estructura secundaria conservada, como puntos de referencia. Se identificaron las secuencias diana potenciales para las sondas de hibridación mediante las variaciones registradas en la homología de las secuencias alineadas en ciertas regiones discretas (regiones variables) de las secuencias de ARNr y ADNr.

La evolución de la secuencia en cada una de las regiones variables es en su mayor parte, divergente. A causa de la divergencia, las especies filogenéticamente relacionadas más distantes de *Neisseria meningitidis* ó *Neisseria gonorrhoeae* tienden a mostrar una variabilidad mayor en una región variable dada, más que en las especies filogenéticamente relacionadas más próximas. La suficiente variación observada entre las especies de *Neisseria meningitidis* y la *Neisseria gonorrhoeae*, se ha empleado para identificar sitios diana preferidos y sondas de diseño útiles.

Hemos identificado secuencias que varían entre *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae*, entre éstas y otras especies de *Neisseria*, y entre miembros del género *Neisseria* y otros organismos mediante análisis comparativo de las secuencias de ARNr publicadas en la literatura o determinadas en el laboratorio. Los ordenadores y los programas de ordenador que pueden emplearse o adaptarse para la finalidad descrita, están comercialmente disponibles. Hemos visto la suficiente diferencia entre los organismos diana y el organismo filogenéticamente más estrechamente relacionado, con probabilidad de ser encontrado en la misma muestra para diseñar las actuales sondas. Las cepas de *Neisseria meningitidis* han sido clasificadas en tres grupos de secuencias en la región de la sonda representada por los serogrupos A, C y L.

La mera identificación de las secuencias de nucleótidos diana supuestamente único potencial, no garantiza que pueda obtenerse una sonda de ensayo de hibridación funcionalmente específica de una especie para hibridar con el ARNr ó ADNr de *Neisseria* que comprende dicha secuencia. Otros varios factores determinarán la idoneidad de un locus de ácido nucleico como un sitio diana para sondas específicas de una especie. A causa de que la extensión y especificidad de las reacciones de hibridación tales como las descritas en la presente, están afectadas por un número de factores, la manipulación de uno o más de estos factores determinará la exacta sensibilidad y especificidad de un particular oligonucleótido, bien sea perfectamente complementario a su diana o no. La importancia y efecto de varias condiciones del ensayo son ya conocidos por los expertos en la técnica como se describe en Hogan *et al.*, PCT/US87/03009, y Hogan y Hammond, patente U.S. n° 5.216.143, y Kohne, patente U.S. n° 4.851.330 las cuales comparten la misma asignación que la presente solicitud.

La temperatura deseada de hibridación y la composición de la solución de hibridación (tal como concentración de sal, detergentes y otros solutos) pueden también afectar grandemente la estabilidad de los híbridos de doble cadena. Las condiciones tales como la fuerza iónica y la temperatura a la cual la sonda podrá hibridar con la diana debe tenerse en cuenta en la construcción de una sonda específica de un grupo o de una especie. La estabilidad térmica de los ácidos nucleicos del híbrido aumenta generalmente con la fuerza iónica de la mezcla de reacción. Por otro lado, los reactivos químicos que rompen los puentes de hidrógeno, tales como la formamida, urea, dimetil sulfóxido y alcoholes, pueden reducir grandemente la estabilidad térmica de los híbridos.

Para maximizar la especificidad de una sonda para su diana, las sondas objeto de la presente invención fueron diseñadas para hibridar con sus dianas en condiciones de alta restrictividad. En dichas condiciones, solamente hibridarán entre sí, las cadenas simples de ácido nucleico con un alto grado de complementariedad, y las cadenas simples de ácido nucleico sin este alto grado de complementariedad no formarán híbridos. En consecuencia la restrictividad de las condiciones del ensayo determina la cantidad de complementariedad que debería existir entre dos cadenas de ácido nucleico con el fin de formar un híbrido. La restrictividad se escoge para maximizar la diferencia de estabilidad entre el híbrido formado entre la sonda y el ácido nucleico diana y los híbridos potenciales entre la sonda y cualesquiera ácidos nucleicos no diana, presentes.

La especificidad apropiada puede lograrse minimizando la longitud de la sonda que tiene una perfecta complementariedad con la secuencia de organismos no diana, evitando las regiones ricas en G y C de homología con secuencias no diana, y construyendo la sonda de forma que tenga tantos desapareamientos desestabilizantes con secuencias no diana como sea posible. El que una secuencia de sonda sea útil para detectar solamente un tipo específico de organis-

mo, depende en gran manera de la diferencia de estabilidad térmica entre los híbridos sonda:diana frente a potenciales híbridos sonda:no diana. En sondas de diseño, las diferencias en los valores T_m entre estos híbridos deberían ser tan grandes como fuera posible (de preferencia aproximadamente 5°C ó más). La manipulación de la T_m puede lograrse mediante cambios de la longitud de la sonda y de la composición de la sonda (contenido GC frente a contenido AT).

En general, la temperatura de hibridación óptima para sondas de oligonucleótidos de aproximadamente 10-50 nucleótidos de longitud es aproximadamente 5°C por debajo de la temperatura de fusión de un dúplex dado. La incubación a temperaturas por debajo de la temperatura óptima puede permitir que secuencias de bases desparejadas hibriden y por lo tanto pueda decrecer la especificidad. Cuanto más larga es la sonda más puentes de hidrógeno entre pares de bases y, en general, una T_m más alto. Aumentando el porcentaje de G y C aumenta también la T_m debido a que el par de bases G-C presenta un puente de hidrógeno adicional y por lo tanto mayor estabilidad térmica que los pares de bases A-T.

Un método preferido para determinar la T_m consiste en medir la hibridación empleando un Ensayo de Protección de la Hibridación (HPA) de acuerdo con Arnold *et al.*, patente U.S. N° 5.283.174, la cual disfruta la propiedad exclusiva junto con la presente aplicación. La T_m puede medirse empleando el HPA de la siguiente manera. Se forma un híbrido sonda:diana en solución tamponada de succinato de litio (tampón de succinato de litio 0,1 M, pH 5,0, ácido etilendiamin-tetracético (EDTA) 2 mM, de ácido etilenglicol-bis(β -amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA), 10% (p/v) de laurilsulfato de litio) empleando una cantidad en exceso de diana. A continuación se diluyen alícuotas del híbrido en la solución tamponada de succinato de litio y se incuba durante cinco minutos a varias temperaturas partiendo por debajo de la T_m anticipada, por ejemplo 55°C, e incrementando en incrementos de 2-5°C. Esta solución se diluye a continuación, con una solución de tampón de borato alcalino suave (tetraborato de sodio 0,15 M, pH 7,6, 5% (p/v) de TRITON® X-100) y se incuba a una temperatura inferior (por ejemplo 50°C) durante diez minutos. En estas condiciones el éster de acridinio unido a la sonda monocatenaria se hidroliza mientras el éster de acridinio unido a la sonda hibridada está relativamente protegido de la hidrólisis. Así la cantidad de éster de acridinio que permanece es proporcional a la cantidad de híbrido y puede medirse por la quimioluminiscencia producida por el éster de acridinio después de la adición de peróxido de hidrógeno seguido de álcali. La quimioluminiscencia puede medirse en un luminómetro (p. ej., GenProbe LEADER® I ó LEADER® 50). Los datos resultantes se representan en una gráfica como tanto por ciento de la señal máxima (habitualmente de la temperatura más baja) frente a la temperatura. La T_m se define como la temperatura a la cual se mantiene el 50% de la señal máxima. Además del método de más arriba, la T_m puede determinarse mediante métodos isotópicos ya bien conocidos por los expertos en la técnica (p. ej., Hogan *et al.*, *supra*).

Debe tenerse en cuenta, que la T_m para un híbrido dado, varía en función de la solución de hibridación dada. Factores como la concentración de sal, detergentes, y otros solutos pueden afectar la estabilidad del híbrido durante la desnaturalización térmica (J. Sambrook, E.F. Fritsch y T. Maniatis, 2 *Molecular Cloning* ("Clonación molecular"), ch. 11 (2ª ed. 1989)). En la construcción de una sonda deben tenerse en cuenta las condiciones tales como la fuerza iónica y la temperatura de incubación, bajo las cuales la sonda se empleará para hibridar con la diana. Por otro lado, los reactivos químicos que rompen los puentes de hidrógeno tales como la formamida, urea, dimetilsulfóxido y alcoholes, pueden reducir en gran manera la estabilidad térmica de los híbridos.

Para asegurar que la sonda es específica para su diana, es deseable tener sondas que hibriden solamente en condiciones de alta restrictividad. En condiciones de alta restrictividad solamente se formarán híbridos de ácido nucleico altamente complementarios; híbridos sin un suficiente grado de complementariedad no se formarán. En consecuencia, la restrictividad de las condiciones del ensayo determina la cantidad de complementariedad necesaria entre dos cadenas de ácidos nucleicos para formar un híbrido. La restrictividad se escoge para maximizar la diferencia en estabilidad entre el híbrido formado con la diana y otras secuencias de ácido nucleico.

La longitud de la secuencia del ácido nucleico diana y en consecuencia, la longitud de la secuencia de la sonda puede también ser importante. En algunos casos pueden ser varias secuencias de una región particular, por ejemplo, una región variable que varía en posición y longitud, lo cual produce sondas con las características de hibridación deseada. En otros casos, una sonda puede ser significativamente mejor que otra sonda con una secuencia de nucleótidos que difiere en una única base. Cuando es posible que los ácidos nucleicos que no son perfectamente complementarios, hibriden, el tramo más largo de secuencias de bases perfectamente homólogas, determinará generalmente la estabilidad del híbrido, jugando también un papel la composición de los pares de bases.

Las regiones de ARNr que forman fuertes estructuras internas que inhiben la hibridación son regiones diana menos preferidas por lo menos en ensayos en los cuales no se emplean sondas auxiliares. De manera similar, los diseños de sondas que dan por resultado una extensa autocomplementariedad deben ser evitados. Si una de las dos cadenas está completamente o parcialmente implicada en un híbrido intramolecular o intermolecular, será menos capaz de participar en la formación de un nuevo híbrido intermolecular sonda:diana. Las moléculas de ARN ribosómico son conocidas por formar hélices intramoleculares muy estables y estructuras secundarias mediante puentes de hidrógeno. En el diseño de un ensayo de hibridación, una porción substancial de la secuencia escogida como diana permanece en estado monocatenario hasta que la hibridación con la sonda, la velocidad y extensión de la hibridación entre la sonda y la diana puede ser aumentada en gran manera. Una manera en la que esto puede lograrse es escogiendo como secuencia de nucleótidos diana, una secuencia que no esté relativamente implicada con puentes de hidrógeno intramoleculares. Alternativa o adicionalmente, la sonda del ensayo de hibridación puede emplearse en una mezcla de sondas con oligonucleótidos auxiliares, lo cual puede hacer que el sitio de la sonda sea más accesible para la hibridación con la sonda del ensayo de hibridación.

ES 2 281 077 T3

Una diana de ADN tiene lugar en la naturaleza en forma de doble cadena como producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas dianas de doble cadena son naturalmente inhibidoras a la hibridación con una sonda y necesitan una desnaturalización antes de la hibridación. Las condiciones apropiadas de desnaturalización e hibridación son ya conocidas en la técnica (*p. ej.*, E. M. Southern, *J. Mol. Biol.* 98:503 (1975)).

Se dispone de un cierto número de fórmulas que proporcionan una estimación de la temperatura de fusión para emparejar perfectamente los oligonucleótidos con sus ácidos nucleicos diana.

Una de dichas fórmulas,

$$T_m = 81,5 + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41(\text{fracción G+C}) - (600/N)$$

(en donde N = longitud del oligonucleótido en número de nucleótidos), proporciona una buena estimación de la T_m para oligonucleótidos entre 14 y 60 ó 70 nucleótidos de longitud. A partir de dichos cálculos, la subsiguiente verificación empírica o “fine tuning” (ajuste fino) de la T_m puede hacerse empleando técnicas de screening ya bien conocidas en la especialidad. Para más información sobre la hibridación y sondas de oligonucleótidos véase *p. ej.*, Sambrook *et al.*, 2 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (“Clonación molecular: un Manual de Laboratorio”) (Cold Springs Harbor Laboratory Press 1989) (en el capítulo 11). Esta referencia, entre otras ya bien conocidas en la especialidad, proporciona también estimaciones del efecto de los emparejamientos sobre la T_m de un híbrido. Así, a partir de la secuencia de nucleótidos conocida de una región dada del ARN ribosómico (ó ADNr) de dos o más organismos, pueden diseñarse oligonucleótidos que distinguirán estos organismos unos de otros.

C. Amplificación del ácido nucleico

De preferencia, los oligonucleótidos de amplificación de la presente invención, son oligodesoxinucleótidos y son lo suficientemente largos para ser empleados como sustrato para la síntesis de productos de extensión mediante una polimerasa de ácido nucleico. La longitud óptima de los cebadores debe tener en cuenta varios factores, incluyendo la temperatura de reacción, la estructura y composición de las bases del cebador, y cómo debe emplearse el cebador. Por ejemplo, para la especificidad óptima el cebador de oligonucleótidos generalmente debe contener por lo menos aproximadamente 12 nucleótidos en función de la complejidad de la secuencia del ácido nucleico diana. Si dicha especificidad no es esencial, pueden emplearse cebadores más cortos; en este caso, puede ser deseable efectuar la reacción a temperaturas más bajas con el fin de formar complejos híbridos estables con el ácido nucleico del molde.

Se describen en la presente pautas útiles para el diseño de oligonucleótidos de amplificación y sondas con las deseadas características. Nuestras mejores regiones diana de la modalidad contienen por lo menos dos y de preferencia, tres regiones conservadas de ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoeae*. Estas regiones tienen aproximadamente 15-350 nucleótidos de longitud, de preferencia 15-150.

El grado de amplificación observado con un juego de cebadores o cebadores promotores depende de varios factores, incluyendo la capacidad de los oligonucleótidos de hibridar con sus secuencias complementarias y su capacidad de ser extendidos o copiados enzimáticamente. Aunque pueden emplearse oligonucleótidos de diferentes longitudes y composición de las bases, los oligonucleótidos preferidos en esta invención tienen regiones diana de unión de 18-40 bases con un T_m previsto con la diana de aproximadamente 65°C.

Los parámetros que afectan a la hibridación de una sonda, tales como la T_m , la complementariedad y la estructura secundaria de la secuencia diana afectan también la hibridación del cebador y por lo tanto el rendimiento. El grado de extensión no específica (cebador-dímero o copia no diana) puede también afectar la eficiencia de la amplificación, por lo tanto los cebadores se seleccionan para que tengan una baja autocomplementariedad o complementariedad cruzada, particularmente en los extremos 3' de la secuencia. Se evitan los tramos homopolímeros largos y un alto contenido de GC para reducir la falsa extensión del cebador. Existen programas de ordenador disponibles para ayudar en este aspecto del diseño.

Una polimerasa de ácido nucleico empleada conjuntamente con los oligonucleótidos de amplificación de la presente invención, se refiere a un agente químico, físico o biológico que incorpora o bien ribo o bien desoxirribonucleótidos, o ambos, en un polímero de ácido nucleico, o una cadena, de una manera dependiente del molde. Ejemplos de polimerasas de ácido nucleico incluyen las ADN polimerasas dirigidas al ADN, ADN polimerasas dirigidas al ARN, y ARN polimerasas dirigidas al ARN. Las ADN polimerasas inducen la síntesis del ácido nucleico de manera dependiente del molde y en una dirección 5' a 3'. Debido a la orientación antiparalela de las dos cadenas en un ácido nucleico de doble cadena, esta dirección es desde una región 3' del molde a una región 5' del molde. Ejemplos de ADN polimerasas dirigidas al ADN incluyen la ADN polimerasa I de *E. coli*, la ADN polimerasa termoestable del *Thermus aquaticus* (Taq), y el fragmento grande de la ADN polimerasa I del *Bacillus stearothermophilus* (Bst). Ejemplos de ADN polimerasas dirigidas al ARN incluyen varias transcriptasas inversas retrovíricas, tales como la transcriptasa inversa del virus de la leucemia del ratón Moloney (MMLV), o la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis de las aves (AMV).

Durante la mayor parte de reacciones de amplificación del ácido nucleico, una polimerasa de ácido nucleico añade radicales de nucleótido al extremo 3' del cebador empleando el ácido nucleico diana como un molde, sintetizando así

una segunda cadena de ácido nucleico con una secuencia de nucleótidos parcial o completamente complementaria a una región del ácido nucleico diana. En muchas reacciones de amplificación de ácido nucleico, las dos cadenas que comprenden la estructura bicatenaria resultante deben separarse por medios químicos o físicos con el fin de permitir que la reacción de amplificación tenga lugar. Alternativamente, la cadena del molde recién sintetizada puede estar
 5 construida de manera que esté disponible para la hibridación con un segundo cebador o promotor-cebador mediante otros medios, p. ej., a través de un desplazamiento o el empleo de una enzima nucleolítica que digiere parte o toda la cadena de la diana original. De esta manera, el proceso puede repetirse durante un número de ciclos, dando por resultado un gran aumento del número de moléculas de ácido nucleico que poseen la secuencia de nucleótidos diana.

Tanto el primero como el segundo oligonucleótido de amplificación, o ambos, pueden ser un cebador-promotor. Dicho cebador-promotor contiene normalmente secuencias de nucleótidos que no son complementarias a las de la molécula de ácido nucleico diana, o producto(s) de extensión del cebador. Por ejemplo, Kacian y Fultz, patente U.S. n° 5.399.491 describe varios de dichos oligonucleótidos. Estas secuencias no complementarias pueden estar localizadas en 5' en las secuencias complementarias del oligonucleótido de amplificación, y pueden proporcionar un locus para la
 15 iniciación de la síntesis de ARN cuando se efectúa en doble cadena a través de la acción de una polimerasa de ácido nucleico. El promotor así proporcionado puede permitir la transcripción *in vitro* de múltiples copias de ARN de la secuencia de ácido nucleico diana. Se apreciará que cuando en esta especificación se hace referencia a un cebador, se pretende que dicha referencia incluya el aspecto de cebador de un promotor-cebador, a no ser que el contexto de la referencia indique claramente otra cosa.

En algunos sistemas de amplificación, por ejemplo, el método de amplificación de Dattagupta *et al.*, *supra*, los oligonucleótidos de amplificación puedan contener nucleótidos no-complementarios 5', los cuales ayudan al desplazamiento de la cadena. Además, cuando se emplea conjuntamente con una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad exonucleasa 5', los oligonucleótidos de amplificación pueden tener modificaciones en su extremo 5' para
 25 evitar la digestión enzimática. Alternativamente, la polimerasa de ácido nucleico puede modificarse para eliminar la actividad 5' exonucleasa, como p. ej., mediante tratamiento con una proteasa que genera un fragmento de polimerasa activa sin dicha actividad de nucleasa. En tal caso, los oligonucleótidos no necesitan ser modificados en su extremo 5'.

1. Preparación de oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos de amplificación de la presente invención pueden ser fácilmente preparados por métodos ya conocidos en la técnica. De preferencia, los cebadores se sintetizan empleando métodos en fase sólida. Por ejemplo, Caruthers, *et al.*, describe el empleo de la química estándar en fase sólida de la fosforamidita para unir nucleótidos mediante enlaces fosfodiéster. La síntesis química en fase sólida automatizada empleando precursores de cianoetil fosforamidita ha sido descrita por Barone *et al.*, *Nucleic Acids Research* ("Investigación de ácidos nucleicos"), 12:405 (1984). (*Methods in Enzymology* ("Métodos de Enzimología"), volumen 143, pg. 287 (1987)). Igualmente, Bhatt describe un procedimiento para la síntesis de oligonucleótidos conteniendo enlaces fosforotioato. (WO92/04358, titulado "Method and Reagent for Sulphurization of Organophosphorous Compounds" ("Método y reactivo para la sulfurización de compuestos organofosforados"), el cual disfruta de la propiedad común con la presente invención). También Klem *et al.*, titulado "Improved Process for the Synthesis of Oligomers" ("Procedimiento perfeccionado para la síntesis de oligómeros"), PCT WO 92/07864, describe la síntesis de oligonucleótidos conteniendo diferentes enlaces incluyendo enlaces metilfosfonato. Además, los métodos para la síntesis orgánica de oligonucleótidos son ya conocidos por los expertos en la técnica, y están descritos en Sambrook, *et al.*, *supra*.

Después de la síntesis y purificación de un oligonucleótido particular, pueden emplearse varios diferentes procedimientos para purificar y controlar la calidad del oligonucleótido. Procedimientos adecuados incluyen la electroforesis sobre gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alta presión. Ambos procedimientos son ya bien conocidos por los expertos en la técnica.

Todos los oligonucleótidos de la presente invención, bien sean sondas de ensayo de hibridación, oligonucleótidos de amplificación, u oligonucleótidos auxiliares, pueden ser modificados con grupos químicos para potenciar su rendimiento o para facilitar la caracterización de los productos de amplificación. Por ejemplo, los oligonucleótidos modificados en su estructura tales como los que tienen grupos fosforotioato o metilfosfonato, los cuales convierten a los oligonucleótidos en resistentes a la actividad nucleolítica de ciertas polimerasas o las enzimas de nucleasa, pueden permitir el empleo de dichas enzimas en una reacción de amplificación u otra. Otro ejemplo de modificación implica el empleo de engarces no-nucleótidos (p. ej., Arnold *et al.*, "Non-Nucleotide Linking Reagents for Nucleotide Probes" ("Reactivos no-nucleótidos de engarce para sondas nucleótidas"), EP 0 313 219, incorporados entre nucleótidos en la cadena de ácido nucleico los cuales no interfieren con la hibridación o el alargamiento del cebador. Los oligonucleótidos de amplificación pueden contener también mezclas de los nucleótidos deseados modificados y los nucleótidos naturales.

El extremo 3' de un oligonucleótido de amplificación puede estar bloqueado para evitar la iniciación de la síntesis del ADN, como describe McDonough *et al.*, en el trabajo titulado "Nucleic Acid Sequence Amplification" ("Amplificación de la secuencia de un ácido nucleico"), patente WO94/03472, la cual disfruta de la propiedad común con la presente invención. Una mezcla de diferentes oligonucleótidos de amplificación bloqueados en 3' ó de oligonucleótidos bloqueados y no bloqueados en 3', puede aumentar la eficiencia de la amplificación del ácido nucleico, como se ha descrito en la presente.

ES 2 281 077 T3

Como se ha descrito más arriba, el extremo 5' de los oligonucleótidos puede ser modificado para que sea resistente a la actividad de la 5'-exonucleasa presente en algunas polimerasas de ácido nucleico. Estas modificaciones pueden efectuarse añadiendo un grupo no nucleótido al nucleótido terminal 5' del cebador, empleando técnicas como las descritas por Arnold, *et al.*, *supra*, en el trabajo titulado "Non-Nucleotide Linking Reagents for Nucleotide Probes" ("Reactivos no-nucleótidos de engarce para sondas de nucleótidos").

Una vez sintetizadas, las sondas de oligonucleótidos seleccionadas pueden ser marcadas por cualquiera de los métodos ya bien conocidos (*p. ej.*, J. Sambrook, *supra*). Las marcas útiles incluyen los radioisótopos así como también grupos informadores no-radioactivos. Las marcas isotópicas incluyen H³, S³⁵, P³², I¹²⁵, Co⁵⁷ y C¹⁴. Las marcas isotópicas pueden introducirse en los oligonucleótidos mediante técnicas ya conocidas en la especialidad tales como el desplazamiento de la mella, marcado del extremo, síntesis de la segunda cadena, el empleo de la transcripción inversa, y mediante métodos químicos. Cuando se emplean sondas radiomarcadas, la hibridación puede detectarse mediante autorradiografía, contaje por centelleo, o contaje gamma. El método de detección seleccionado dependerá del radioisótopo particular empleado para el marcado.

Los materiales no isotópicos pueden también emplearse para el marcado, y pueden introducirse internamente en la secuencia del ácido nucleico o en el extremo de la secuencia del ácido nucleico. Los nucleótidos modificados pueden ser incorporados enzimáticamente o químicamente. Las modificaciones químicas de la sonda pueden ser efectuadas durante o después de la síntesis de la sonda, por ejemplo, a través del empleo de grupos de engarce no-nucleótidos como ha descrito Arnold *et al.*, *supra* "Non-Nucleotide Linking Reagents for Nucleotide Probes" ("Reactivos de engarce no-nucleótidos para sondas de nucleótidos"). Marcas no-isotópicas incluyen moléculas fluorescentes, moléculas quimioluminiscentes, enzimas, cofactores, substratos de enzimas, haptenos u otros ligandos.

De preferencia, las sondas se marcan con un éster de acridinio. El marcado con éster de acridinio puede realizarse como ha descrito Arnold *et al.*, patente U.S. n° 5.185.439, titulada "Acridinium Ester Labeling and Purification of Nucleotide Probes" ("Marcado con éster de acridinio y purificación de las sondas de nucleótidos") publicada el 9 Febrero 1993.

2. Amplificación del ARNr y ADNr de *Neisseria*

Los oligonucleótidos de amplificación de la presente invención están dirigidos particularmente a las secuencias de nucleótidos del ARNr de 16S de *Neisseria gonorrhoeae*, o sus contrapartidas de ADNr. Estos oligonucleótidos de amplificación pueden flanquear, solapar o estar contenidos dentro de por lo menos una de las secuencias diana de nucleótidos empleadas como una sonda de ensayo de hibridación para detectar la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* en un ensayo de amplificación de ácido nucleico. Los oligonucleótidos de amplificación descritos y reivindicados en la presente comprenden dos juegos de oligonucleótidos de amplificación. Los miembros del juego de oligonucleótidos de amplificación de la presente invención son capaces de hibridar con una secuencia de ácido nucleico diana que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 19,20,49,51 mientras otros oligonucleótidos descritos en la presente son capaces de hibridar con un ácido nucleico que tiene o que substancialmente corresponde a una de las siguientes secuencias de nucleótidos:

SEQ ID NO: 23 GTCTTGAGAG GGAAAGCAGG GGAC

SEQ ID NO: 24 TATGTTACTC ACCCGTTTCGC CACTCGCC

SEQ ID NO: 21 CGATGACGGT ACCTGAAGAA TAAGCACCGG CTAAC

SEQ ID NO: 22 GTCCTTTACA ACCCGAAGGC CTTC

SEQ ID NO: 47 GUCUUGAGAG GGAAAGCAGG GGAC

SEQ ID NO: 48 UAUGUUACUC ACCCGUUCGC CACUCGCC

SEQ ID NO: 50 CGAUGACGGU ACCUGAAGAA UAAGCACCGG CUAAC

Y

SEQ ID NO: 52 GUCCUUUACA ACCCGAAGGC CUUC

En versiones preferidas estos nucleótidos de amplificación de la presente invención comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 7,9,43 y 45 mientras otros oligonucleótidos de amplificación descritos en la presente tienen, o substancialmente corresponden a las siguientes secuencias:

ES 2 281 077 T3

SEQ ID NO: 5 GTCCCCTGCT TTCCCTCTCA AGAC
 SEQ ID NO: 6 GGCGAGTGGC GAACGGGTGA GTAACATA
 5 SEQ ID NO: 8 GTTAGCCGGT GCTTATTCTT CAGGTACCGT CATCG
 SEQ ID NO: 10 GAAGGCCTTC GGGTTGTAAA GGAC
 10 SEQ ID NO: 41 GUCCCCUGCU UUCCCUUCA AGAC
 SEQ ID NO: 42 GGCGAGUGGC GAACGGGUGA GUAACAU
 15 SEQ ID NO: 44 GUUAGCCGGU GCUUAUUCUU CAGGUACCGU CAUCG
 SEQ ID NO: 46 GAAGGCCUUC GGGUUGUAAA GGAC

20 Estos oligonucleótidos pueden también tener bases adicionales no complementarias en su extremo 5' comprendiendo una secuencia promotora capaz de unir una ARN polimerasa y dirigir la transcripción de ARN empleando el ácido nucleico diana como un molde. Por ejemplo, puede emplearse el promotor

SEQ ID NO: 53 AATTTAATAC GACTCACTAT AGGGAGA.

25 Todos los oligonucleótidos de amplificación de la presente invención pueden tener secuencias que no contienen modificaciones o adiciones a estas secuencias. Los oligonucleótidos de amplificación pueden tener también o tener alternativamente, términos bloqueados como los términos 3' y/ó 5', ó adiciones incluyendo pero no limitadas a la adición de una secuencia nucleótida específica que es reconocida por una ARN polimerasa (p. ej., la secuencia promotora para T7, T3, ó SP6 ARN polimerasa), adición de secuencias las cuales potencian la iniciación o alargamiento de la transcripción del ARN mediante una ARN polimerasa, o secuencias que pueden proporcionar el emparejamiento de bases intramoleculares y estimular la formación de estructuras secundarias o terciarias de ácido nucleico.

30 Los oligonucleótidos de amplificación se emplean en un procedimiento de amplificación de ácido nucleico tal como la reacción en cadena de la polimerasa o una reacción de amplificación empleando la ARN polimerasa, ADN polimerasa y ARNasa H ó su equivalente, como describe Kacian y Fultz *supra*, Dattagupta *et al.*, *supra* y por Sninsky *et al.*, patente U.S. n° 5.079.351; los dos primeros de los cuales disfrutan de la propiedad común con la presente invención.

35 Una amplia variedad de métodos están disponibles para detectar una secuencia diana amplificada. Por ejemplo, los substratos de nucleótido o los cebadores pueden incluir una marca detectable la cual se incorpora en el ADN recién sintetizado. El producto de amplificación marcado resultante se separa a continuación de los nucleótidos o cebadores marcados que no han intervenido, y la marca se detecta en la fracción de producto separado.

40 Las sustancias que pueden servir como marcas detectables útiles son ya bien conocidas en la técnica e incluyen isótopos radiactivos, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, cromóforos, así como también ligandos tales como la biotina y haptenos, los cuales cuando no son directamente detectables, pueden ser fácilmente detectables mediante una reacción con formas marcadas de sus compañeros de unión específicos, p. ej., avidina y anticuerpos, respectivamente.

45 Otro método consiste en detectar el producto de amplificación mediante la hibridación con una sonda de ácido nucleico marcado detectablemente y midiendo los híbridos resultantes con cualquiera de las maneras convencionales. En particular, el producto puede ser ensayado mediante hibridación de una sonda de ácido nucleico marcada con éster de acridinio quimioluminiscente, con la secuencia diana, hidrolizando selectivamente el éster de acridinio presente en la sonda sin hibridar, y midiendo la quimioluminiscencia producida a partir del éster de acridinio remanente, en un luminómetro (ver p. ej., Arnold, *et al.*, *supra*, patente U.S. n° 5.283.174, y Nelson *et al.*, "Non-Isotopic DNA Probe Technologies" ("Tecnologías con sondas de ADN no isotópicas"), Academic Press, San Diego (Kricka, ed. 1992).

60 D. Sondas para ensayo de hibridación de oligonucleótidos con ARNr y ADNr de *Neisseria meningitidis* o *Neisseria gonorrhoeae*

65 Las sondas de ensayo de hibridación de oligonucleótidos descritas en la presente son capaces de hibridar con ácidos nucleicos diana de ARNr de *Neisseria meningitidis* o secuencias nucleótidas de ADNr sobre ácidos nucleicos de especies bacterianas filogenéticamente estrechamente relacionadas. Estas sondas de ensayo de hibridación fueron diseñadas, seleccionadas y/o escogidas tomando como base la comparación de las secuencias de nucleótidos de las correspondientes regiones del ARN ribosómico de la *Neisseria meningitidis* y dichas especies filogenéticamente estrechamente relacionadas. En versiones preferidas estas sondas hibridan selectivamente con los ácidos nucleicos de la *Neisseria meningitidis* por encima de los ácidos nucleicos de la *Neisseria gonorrhoeae*.

ES 2 281 077 T3

Se describen sondas de hibridación de oligonucleótidos que hibridan selectivamente con los ácidos nucleicos de la *Neisseria meningitidis* y no con los ácidos nucleicos de la *Neisseria gonorrhoeae* e incluyen secuencias de ácidos nucleicos de *Neisseria meningitidis* que tienen o que corresponden substancialmente a las siguiente secuencias de ácido nucleico:

5 SEQ ID NO: 11 GGCTGTTGCT AATATCAGCG

10 SEQ ID NO: 12 GGCTGTTGCT AATACCAGCG

SEQ ID NO: 15 CGCTGATATT AGCAACAGCC

15 SEQ ID NO: 16 CGCTGGTATT AGCAACAGCC

SEQ ID NO: 25 GGCUGUJUGCU AAUAUCAGCG

20 SEQ ID NO: 26 GGCUGUJUGCU AAUACCAGCG

SEQ ID NO; 27 CGCUGAUUU AGCAACAGCC

25 SEQ ID NO: 28 CGCUGGUAUU AGCAACAGCC

Un número de sondas de ensayo de hibridación de oligonucleótidos de la presente invención hibridan de preferencia con los ácidos nucleicos diana que contienen el ARNr de la *Neisseria gonorrhoeae*, o con secuencias de nucleótidos de ADNr, más que con los ácidos nucleicos de otras especies bacterianas filogenéticamente estrechamente relacionadas. En versiones preferidas, estas sondas de ensayo de hibridación pueden distinguir los ácidos nucleicos de la *Neisseria gonorrhoeae* de los de la *Neisseria meningitidis*.

Las sondas de hibridación de la presente invención que hibridan selectivamente con los ácidos nucleicos derivados de la *Neisseria gonorrhoeae* y no con los ácidos nucleicos de la *Neisseria meningitidis* están descritos en las reivindicaciones 17-27, mientras que otras sondas de hibridación descritas en la presente tienen o substancialmente corresponden a las siguientes secuencias de nucleótidos:

40 SEQ ID NO 1: GAACGTACCG GGTAGCGG

SEQ ID NO 29: CCGCTACCCG GTACGTTC

45 SEQ ID NO 31: GAACGUACCG GGUAGCGG

SEQ ID NO 33: CCGCUACCCG GUACGUUC

Las sondas de ensayo de hibridación de oligonucleótidos de la presente invención están de preferencia marcadas con un grupo informador como p. ej., un grupo radioisótopo, un fluorescente o quimioluminiscente, con una enzima u otro ligando, que puede emplearse para la detección o confirmación de que la sonda ha hibridado con la secuencia diana. El solicitante prefiere más el empleo de los ésteres de acridinio como marcas. *Ver p. ej.*, Arnold *et al.*, patente U.S. n° 5.185.439. La sonda de ensayo se mezcla con una muestra, la cual se sospecha que contiene un ácido nucleico que tiene una secuencia diana, en condiciones de hibridación adecuadas para permitir la reasociación de las dos cadenas mediante puentes de hidrógeno en la región de complementariedad.

La sonda debe también combinarse con uno o más oligonucleótidos auxiliares sin marcar para facilitar la unión al ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos diana de la *Neisseria meningitidis* ó *Neisseria gonorrhoeae*. La sonda hibrida a continuación con un ácido nucleico diana presente en la muestra; el duplex híbrido resultante puede separarse y detectarse mediante varias técnicas ya bien conocidas en la especialidad, tales como la adsorción de hidroxapatita y motorización radiactiva. También están incluidas entre estas técnicas, aquellas que implican la degradación selectivamente de la marca presente sobre la sonda sin hibridar y a continuación midiendo la cantidad de marca asociada con la sonda hibridada restante, como describe Arnold *et al.*, patente U.S. n° 5.283.174, la cual disfruta de la común propiedad con la presente solicitud. Esta última técnica se prefiere actualmente por los solicitantes.

ES 2 281 077 T3

E. Oligonucleótidos auxiliares empleados en la detección de la *Neisseria*

Se emplearon oligonucleótidos auxiliares específicos para facilitar la hibridación de las sondas del ensayo de hibridación con el ácido nucleico diana. Los oligonucleótidos auxiliares están descritos en Hogan y Milliman, patente U.S. n° 5.030.557 titulada *Means and Method for Enhancing Nucleic Acid Hybridization* ("Medios y método para potenciar la hibridación del ácido nucleico"), la cual disfruta de la común propiedad con la presente solicitud.

Se seleccionan sondas auxiliares para hibridar con secuencias de ácido nucleico situadas cerca de la región clasificada como diana mediante la sonda de ensayo de hibridación. La hibridación de la sonda auxiliar altera la estructura secundaria y terciaria del ácido nucleico diana, facilitando la hibridación de la sonda con el ácido nucleico diana.

Los oligonucleótidos auxiliares específicos para facilitar la detección específica de los ácidos nucleicos de la *Neisseria meningitidis*, tienen o substancialmente corresponden a una de estas secuencias de nucleótidos:

15 SEQ ID NO: 13 GCCTTCGGGT TGTAAGGAC TTTTGTCAGG GAAGAAA
 SEQ ID NO: 14 GCTGATGACG GTACCTGAAG AATAAGCACC GGC
20 SEQ ID NO: 17 TTTTCTTCCC TGACAAAAGT CCTTTACAAC CCGAAGGC
 SEQ ID NO: 18 GCCGGTGCTT ATTCTTCAGG TACCGTCATC AGC
25 SEQ ID NO: 35 GCCUUCGGGU UGUAAAGGAC UUUUGUCAGG GAAGAAA
 SEQ ID NO: 36 GCUGAUGACG GUACCUGAAG AAUAAGCACC GGC
30 SEQ ID NO: 37 UUUUCUCCC UGACAAAAGU CCUUUACAAC CCGAAGGC
 SEQ ID NO: 38 GCCGGUGCUU AUUCUUCAGG UACCGUCAUC AGC

35 Las sondas de hibridación dirigidas a los ácidos nucleicos de la *Neisseria meningitidis* corresponden substancialmente a las SEQ ID NOS: 11, 12, 25 ó 26 empleadas en una mezcla de sondas juntamente con un oligonucleótido auxiliar que tiene o corresponde substancialmente a la secuencia de nucleótidos de:

40 SEQ ID NOS: 13, 14, 35 y 36

Otra sonda de ensayo de hibridación dirigida a los ácidos nucleicos de la *Neisseria meningitidis* que corresponde substancialmente a

45 SEQ ID NOS: 15, 16, 27 ó 28

se utiliza en una mezcla de sondas juntamente con un oligonucleótido auxiliar que tiene o corresponde substancialmente a la secuencia de nucleótidos de:

50 SEQ ID NOS: 17, 18, 37 y 38

Otra sonda de hibridación dirigida al ácido nucleico ribosómico de la *Neisseria gonorrhoeae* que corresponde substancialmente a

55 SEQ ID NOS: 1 ó 31

se utiliza en una mezcla juntamente con un oligonucleótido auxiliar que tiene o corresponde substancialmente a la secuencia de nucleótidos de:

60 SEQ ID NOS: 2 ó 39

En versiones preferidas, una sonda de hibridación dirigida a los ácidos nucleicos de la *Neisseria gonorrhoeae* que corresponde substancialmente a

65 SEQ ID NOS: 3 ó 32

se utiliza en una mezcla de sondas juntamente con un oligonucleótido auxiliar que tiene o corresponde substancialmente a la secuencia de nucleótidos de:

SEQ ID NOS: 4 ó 40

Los oligonucleótidos auxiliares pueden emplearse generalmente en condiciones restrictivas de hibridación, pero no son necesariamente específicas de especies.

5 F. *Composiciones de ácidos nucleicos*

En otro aspecto relacionado, la invención se refiere a composiciones como se describen en las reivindicaciones 32 y 33. Esta composiciones comprenden un híbrido de ácido nucleico entre una sonda de ensayo de hibridación y una secuencia de ácido nucleico substancialmente complementaria a la misma (sonda:diana). Un empleo para el híbrido formado entre sonda y diana es para detectar la presencia de una secuencia diana. Por ejemplo, el éster de acridinio ("AE") presente en híbridos es resistente a la hidrólisis en solución alcalina mientras que el AE presente en ácido nucleico monocatenario se hidroliza en solución alcalina (Arnold *et al.*, con el título "Homogenous Protection Assay" ("Ensayo homogéneo de protección"), solicitud EPO número 88308767.8, publicación número 309230, y patente U.S. n° 5.238.174. De acuerdo con ello, puede detectarse la presencia de ácidos nucleicos diana después de la hidrólisis de la sonda marcada con AE, no unida, midiendo la quimioluminiscencia del éster de acridinio restante asociado con el híbrido de ácido nucleico.

La presente invención comprende también composiciones que comprenden un híbrido de ácido nucleico entre un oligonucleótido de amplificación y una secuencia de ácido nucleico substancialmente complementaria al mismo (cebador:diana). Un empleo del híbrido de ácido nucleico formado entre el cebador y la diana es el proporcionar un sitio de iniciación para una polimerasa de ácido nucleico en el extremo 3' del oligonucleótido de amplificación. Por ejemplo, los híbridos pueden formar un sitio de iniciación para transcriptasa inversa, ADN polimerasas tales como la Taq polimerasa o la T4 ADN polimerasa y ARN polimerasas tales como la T7 polimerasa, SP6 polimerasa, T3 polimerasas y similares.

La presente invención se refiere también a composiciones que comprenden híbridos de ácido nucleico entre un oligonucleótido auxiliar y una secuencia de ácido nucleico substancialmente complementaria al mismo (oligonucleótido auxiliar:diana). Un empleo del híbrido entre el oligonucleótido auxiliar y la diana es poder disponer de una secuencia particular de ácido nucleico para la hibridación. Por ejemplo, un híbrido entre un oligonucleótido auxiliar y su diana puede hacer que una secuencia de ácido nucleico sea capaz de hibridar con una secuencia diana disponible para la hibridación con una sonda de hibridación. Una descripción completa del empleo de oligonucleótidos auxiliares viene dada en Hogan y Milliman, patente U.S. n° 5.030.557.

Las composiciones descritas en la presente incluyen composiciones para la detección del ácido nucleico de *Neisseria meningitidis* que comprenden un híbrido de ácido nucleico formado entre un ácido nucleico derivado de la *Neisseria meningitidis* y un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente por lo menos a una de las secuencias de ácido nucleico que siguen:

40 SEQ ID NO: 11 GGCTGTTGCT AATATCAGCG
 SEQ ID NO: 12 GGCTGTTGCT AATACCAGCG
 45 SEQ ID NO: 15 CGCTGATATT AGCAACAGCC
 SEQ ID NO: 16 CGCTGGTATT AGCAACAGCC
 50 SEQ ID NO: 25 GGCUGUUGCU AAUAUCAGCG
 SEQ ID NO: 26 GGCUGUUGCU AAUACCAGCG
 55 SEQ ID NO: 27 CGCUGAUUU AGCAACAGCC
 SEQ ID NO: 28 CGCUGGUAUU AGCAACAGCC
 60 SEQ ID NO: 13 GCCTTCGGGT TGTAAGGAC TTTTGTCAGG GAAGAAAA
 SEQ ID NO: 14 GCTGATGACG GTACCTGAAG AATAAGCACC GGC
 SEQ ID NO: 17 TTTTCTTCCC TGACAAAAGT CCTTTACAAC CCGAAGGC
 65 SEQ ID NO: 18 GCCGGTGCTT ATTCTTCAGG TACCGTCATC AGC

ES 2 281 077 T3

SEQ ID NO: 35 GCCUUCGGGU UGUAAAGGAC UUUUGUCAGG GAAGAAAA

5 SEQ ID NO: 36 GCUGAUGACG GUACCUGAAG AAUAAGCACC GGC

SEQ ID NO: 37 UUUUCUCCC UGACAAAAGU CCUUUACAAC CCGAAGGC

10 SEQ ID NO: 38 GCCGGUGCUU AUUCUUCAGG UACCGUCAUC AGC

SEQ ID NO: 5 GTCCCCTGCT TTCCCTCTCA AGAC

SEQ ID NO: 6 GCGGAGTGGC GAACGGGTGA GTAACATA

15 SEQ ID NO: 7 GCTGCTGCAC GTAGTTAGCC GGTGCTTATT CTTCAG

SEQ ID NO: 8 GTTAGCCGGT GCTTATTCTT CAGGTACCGT CATCG

20 SEQ ID NO: 9 CGGGTTGTAA AGGACTTTTG TCAGGGAAGA AAAGGCCGTT

SEQ ID NO: 10 GAAGGCCTTC GGGTTGTAAA GGAC

25 SEQ ID-NO: 41 GUCCCCUGCU UUCCCUCUCA AGAC

SEQ ID NO: 42 GCGGAGUGGC GAACGGGUGA GUAACAUA

30 SEQ ID NO: 43 GCUGCUGCAC GUAGUUAGCC GGUGCUUAUU CUUCAG

SEQ ID NO: 44 GUUAGCCGGU GCUUAUUCUU CAGGUACCGU CAUCG

35 SEQ ID NO: 45 CGGGUUGUAA AGGACUUUUG UCAGGGAAGA AAAGGCCGUU

SEQ ID NO: 46 GAAGGCCUUC-GGGUUGUAAA GGAC

40 Otras composiciones descritas en la presente incluyen composiciones para la detección de la *Neisseria meningitidis* que comprenden un híbrido de ácido nucleico formado entre un ácido nucleico derivado de la *Neisseria meningitidis* y un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente por lo menos a una de las secuencias de ácido nucleico que siguen:

45 SEQ ID NO: 11 GGCTGTTGCT AATATCAGCG

SEQ ID NO: 12 GGCTGTTGCT AATACCAGCG

50 SEQ ID NO: 15 CGCTGATATT AGCAACAGCC

SEQ ID NO: 16 CGCTGGTATT AGCAACAGCC

55 SEQ ID NO: 25 GGCUGUUGCU AAUAUCAGCG

SEQ ID NO: 26 GGCUGUUGCU AAUACCAGCG

60 SEQ ID NO: 27 CGCUGAUUU AGCAACAGCC

SEQ ID NO: 28 CGCUGGUUU AGCAACAGCC

65 Se han descrito también composiciones para la detección de la *Neisseria meningitidis* que tienen un híbrido de ácido nucleico formado entre un ácido nucleico derivado de la *Neisseria meningitidis* y una sonda de ensayo de hibridación que tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a:

SEQ ID NO: 11 ó SEQ ID NO: 25;

ES 2 281 077 T3

y la cual puede contener también opcionalmente un oligonucleótido auxiliar hibridado con dicho ácido nucleico el cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una de las siguientes secuencias de ácido nucleico:

5 SEQ ID NOS: 13, 14, 35 ó 36.

Se han descrito además composiciones para la detección de la *Neisseria meningitidis* que tienen un híbrido de ácido nucleico formado entre un ácido nucleico derivado de la *Neisseria meningitidis* y una sonda de ensayo de hibridación que tiene una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente a:

10 SEQ ID NO: 12 ó SEQ ID NO: 26;

y el cual puede contener también opcionalmente, un oligonucleótido auxiliar hibridado con dicho ácido nucleico el cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente con una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

15 SEQ ID NOS: 13, 14, 35 ó 36.

Se han descrito también composiciones para la detección de la *Neisseria meningitidis* que tienen un híbrido de ácido nucleico formado entre un ácido nucleico derivado de la *Neisseria meningitidis* y una sonda de ensayo de hibridación que tiene una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente a:

20 SEQ ID NO: 15 ó SEQ ID NO: 27;

y el cual puede contener también opcionalmente, un oligonucleótido auxiliar hibridado con dicho ácido nucleico el cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente con una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

25 SEQ ID NOS: 17, 18, 37 ó 38.

Se han descrito también composiciones para la detección de la *Neisseria meningitidis* que tienen un híbrido de ácido nucleico formado entre un ácido nucleico derivado de la *Neisseria meningitidis* y una sonda de ensayo de hibridación que tiene una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente a:

30 SEQ ID NO: 16 ó SEQ ID NO: 28;

y el cual puede contener también opcionalmente, un oligonucleótido auxiliar hibridado con dicho ácido nucleico el cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente con una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

35 SEQ ID NOS: 17, 18, 37 ó 38.

Se han descrito también composiciones para la detección de la *Neisseria gonorrhoeae* que tienen un híbrido de ácido nucleico formado entre un ácido nucleico derivado de la *Neisseria gonorrhoeae* y una sonda de ensayo de hibridación que tiene una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente a:

40 SEQ ID NO: 1 ó SEQ ID NO: 31;

y el cual puede contener también opcionalmente, un oligonucleótido auxiliar hibridado con dicho ácido nucleico el cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente con una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

45 SEQ ID NOS: 2 ó 39.

La presente invención contempla composiciones para la detección de la *Neisseria gonorrhoeae* que tienen un híbrido de ácido nucleico formado entre un ácido nucleico derivado de la *Neisseria gonorrhoeae* y una sonda de ensayo de hibridación que tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a:

50 SEQ ID NO: 3 ó SEQ ID NO: 32;

y el cual puede contener también opcionalmente, un oligonucleótido auxiliar hibridado con dicho ácido nucleico el cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente con una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

55 SEQ ID NOS: 4 ó 40.

ES 2 281 077 T3

Se han descrito también composiciones para la detección de la *Neisseria meningitidis* que tienen un ácido nucleico derivado de la *Neisseria meningitidis* y un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente a:

5 SEQ ID NOS: 7 ó 43

y/o un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente con por lo menos una secuencia de ácido nucleico de las siguientes:

10 SEQ ID NOS: 9 ó 45

y opcionalmente tiene una sonda de ensayo de hibridación capaz de hibridar con el ácido nucleico de *Neisseria meningitidis*, y la cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente con una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

15 SEQ ID NOS: 11, 15, 25 ó 27

y la cual puede contener también opcionalmente, un oligonucleótido auxiliar el cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente con una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

20 SEQ ID NOS: 13, 14, 35 ó 36.

También se han descrito composiciones para la detección de la *Neisseria meningitidis* que tienen un ácido nucleico derivado de la *Neisseria meningitidis* y un oligonucleótido con una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente a:

25 SEQ ID NOS: 7 ó 43

y/o la cual tiene también un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente por lo menos con una secuencia de ácido nucleico como sigue:

30 SEQ ID NOS: 9 ó 45

y opcionalmente tiene una sonda de ensayo de hibridación capaz de hibridar con los ácidos nucleicos de la *Neisseria meningitidis* y la cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una de las siguientes secuencias de ácido nucleico:

35 SEQ ID NOS: 12, 16, 26 ó 28

y la cual puede contener también opcionalmente un oligonucleótido auxiliar el cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una de las siguientes secuencias de ácido nucleico:

40 SEQ ID NOS: 13, 14, 35 ó 36.

Se han descrito también composiciones para la detección de la *Neisseria meningitidis* que tienen un ácido nucleico derivado de la *Neisseria meningitidis* y un oligonucleótido con una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente a:

45 SEQ ID NOS: 7 ó 43

y/o el cual tiene también un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente por lo menos con una secuencia de ácido nucleico de las siguientes:

50 SEQ ID NOS: 9 ó 45

y opcionalmente tiene una sonda de ensayo de hibridación capaz de hibridar con el ácido nucleico de *Neisseria meningitidis* la cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

55 SEQ ID NOS: 15, 11, 27 ó 25

y la cual puede contener también opcionalmente, un oligonucleótido auxiliar el cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente con una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

60 SEQ ID NOS: 17, 18, 37 ó 38.

ES 2 281 077 T3

Se han descrito también composiciones para la detección de la *Neisseria meningitidis* que tienen un ácido nucleico derivado de la *Neisseria meningitidis* y un oligonucleótido con una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente a:

5 SEQ ID NOS: 7 ó 43

y/o el cual tiene también un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente por lo menos con una secuencia de ácido nucleico como sigue:

10 SEQ ID NOS: 9 ó 45

y opcionalmente tiene una sonda de ensayo de hibridación capaz de hibridar con un ácido nucleico de la *Neisseria meningitidis* y la cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una de las siguientes secuencias de ácido nucleico:

15 SEQ ID NOS: 16, 12, 28 ó 20

y la cual puede contener también opcionalmente, un oligonucleótido auxiliar el cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente con una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

20 SEQ ID NOS: 17, 18, 37 ó 38.

Se han descrito también composiciones para la detección de la *Neisseria meningitidis* que tienen un ácido nucleico derivado de la *Neisseria meningitidis* y un oligonucleótido con una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente a:

SEQ ID NOS: 8 ó 44

30 y/o el cual tiene también un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente por lo menos con una secuencia de ácido nucleico de las siguientes:

SEQ ID NOS: 10 ó 46

35 y opcionalmente tiene una sonda de ensayo de hibridación capaz de hibridar con un ácido nucleico de *Neisseria meningitidis* la cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

SEQ ID NOS: 15, 11, 27 ó 25

40 y la cual puede contener también opcionalmente, un oligonucleótido auxiliar el cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente con una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

SEQ ID NOS: 17, 18, 37 ó 38.

45 Se han descrito también composiciones para la detección de la *Neisseria meningitidis* que tienen un ácido nucleico derivado de la *Neisseria meningitidis* y un oligonucleótido con una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente a:

SEQ ID NO: 8 ó 44

50 y/o el cual tiene también un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente por lo menos con una secuencia de ácido nucleico de las siguientes:

SEQ ID NOS: 10 ó 46

55 y opcionalmente tiene una sonda de ensayo de hibridación capaz de hibridar con un ácido nucleico de *Neisseria meningitidis* el cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

60 SEQ ID NOS: 16, 12, 28 ó 26

y la cual puede contener también opcionalmente, un oligonucleótido auxiliar el cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente con una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

65 SEQ ID NOS: 17, 18, 37 ó 38.

Composiciones preferidas de la presente invención están descritas en las reivindicaciones 32 y 33 mientras otras composiciones descritas en la presente incluyen composiciones para la detección de la *Neisseria gonorrhoeae* que

ES 2 281 077 T3

comprenden un híbrido de ácido nucleico formado entre un ácido nucleico derivado de la *Neisseria gonorrhoeae* y un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente por lo menos a una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

5
SEQ ID NO: 1 GAACGTACCG GGTAGCGG
SEQ ID NO: 29 CCGCTACCCG GTACGTTC
10
SEQ ID NO: 31 GAACGUACCG GGUAGCGG
SEQ ID NO: 33 CCGCUACCCG GUACGUUC
15
SEQ ID NO: 5 GTCCCCTGCT TTCCCTCTCA AGAC
SEQ ID NO: 6 GGCGAGTGGC GAACGGGTGA GTAACATA
20
SEQ ID NO: 8 GTTAGCCGGT GCTTATTCTT CAGGTACCGT CATCG
SEQ ID NO: 10 GAAGGCCTTC GGGTTGTAAA GGAC
25
SEQ ID NO: 41 GUCCCCUGCU UUCCUCUCA AGAC
SEQ ID NO: 42 GGCGAGUGGC GAACGGGUGA GUAACAUA
30
SEQ ID NO: 44 GUUAGCCGGU GCUUAUUCUU CAGGUACCGU CAUCG
SEQ ID NO: 46 GAAGGCCUUC GGGUUGUAAA GGAC
35
SEQ ID NO: 2 GGGATAACTG ATCGAAAGAT CAGCTAATAC CGCATACG
SEQ ID NO: 39 GGGUAACUG AUCGAAAGAU CAGCUAAUAC CGCAUACG

40
Otras composiciones descritas en la presente incluyen composiciones para la detección de la *Neisseria gonorrhoeae* que comprenden un híbrido de ácido nucleico formado entre un ácido nucleico derivado de la *Neisseria gonorrhoeae* y un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente por lo menos a una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

45
SEQ ID NO: 1 GAACGTACCG GGTAGCGG
SEQ ID NO: 31 GAACGUACCG GGUAGCGG
50
SEQ ID NO: 2 GGGATAACTG ATCGAAAGAT CAGCTAATAC CGCATACG
SEQ ID NO: 39 GGGUAACUG AUCGAAAGAU CAGCUAAUAC CGCAUACG
55

Se han descrito también composiciones para la detección de la *Neisseria gonorrhoeae* que tienen un ácido nucleico derivado de la *Neisseria gonorrhoeae* y un oligonucleótido con una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente a:

60
SEQ ID NOS: 5 ó 41

y/o el cual tiene también opcionalmente un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente por lo menos con una secuencia de ácido nucleico de las siguientes:

65
SEQ ID NOS: 6 ó 42

ES 2 281 077 T3

y opcionalmente tiene una sonda de ensayo de hibridación capaz de hibridar con un ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoeae* y el cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

5 SEQ ID NOS: 1, 29, 31 ó 33

y la cual puede contener también opcionalmente, un oligonucleótido auxiliar el cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente con una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

10 SEQ ID NOS: 2 ó 39

Se han descrito también composiciones para la detección de la *Neisseria gonorrhoeae* que tienen un ácido nucleico derivado de la *Neisseria gonorrhoeae* y un oligonucleótido con una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente a:

15 SEQ ID NO: 7 ó 42

y/o el cual tiene opcionalmente una secuencia de ácido nucleico de oligonucleótido que corresponde substancialmente por lo menos con una secuencia de ácido nucleico de las siguientes:

20 SEQ ID NOS: 9 ó 45

y la cual opcionalmente tiene una sonda de ensayo de hibridación capaz de hibridar con un ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoeae* y el cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

25 SEQ ID NOS: 3, 30, 32 ó 34

y la cual puede contener también opcionalmente, un oligonucleótido auxiliar el cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente con una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

30 SEQ ID NOS: 4 ó 40

y la cual tiene también opcionalmente un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente por lo menos a una secuencia de ácido nucleico como las que siguen:

35 SEQ ID NOS: 8 ó 44

Se han descrito también composiciones para la detección de la *Neisseria gonorrhoeae* que tienen un ácido nucleico derivado de la *Neisseria gonorrhoeae* y un oligonucleótido con una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente a:

40 SEQ ID NOS: 10 ó 46

45 y opcionalmente tiene una sonda de ensayo de hibridación capaz de hibridar con los ácidos nucleicos de *Neisseria gonorrhoeae* y la cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

50 SEQ ID NOS: 3, 30, 32 ó 34

y/o la cual puede contener también opcionalmente, un oligonucleótido auxiliar el cual tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente con una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

55 SEQ ID NOS: 4 ó 40

También se describen híbridos de ácido nucleico que comprenden sondas y también por lo menos un oligonucleótido auxiliar que tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente por lo menos con una de las secuencias de ácido nucleico siguientes:

60

65

ES 2 281 077 T3

SEQ ID NO: 13 GCCTTCGGGT TGTAAGGAC TTTTGT CAGG GAAGAAAA

SEQ ID NO: 14 GCTGATGACG GTACCTGAAG AATAAGCACC GGC

SEQ ID NO: 17 TTTTCTTCCC TGACAAAAGT CCTTTACAAC CCGAAGGC

SEQ ID NO: 18 GCCGGTGCTT ATTCTTCAGG TACCGTCATC AGC

SEQ ID NO: 35 GCCUUCGGGU UGUAAGGAC UUUUGUCAGG GAAGAAAA

SEQ ID NO: 36 GCUGAUGACG GUACCUGAAG AAUAAGCACC GGC

SEQ ID NO: 37 UUUUCUCCC UGACAAAAGU CCUUACAAC CCGAAGGC

SEQ ID NO: 38 GCCGGUGCUU AUUCUUCAGG UACCGUCAUC AGC

SEQ ID NO: 2 GGGATAACTG ATCGAAAGAT CAGCTAATAC CGCATACG

SEQ ID NO: 39 GGGUAACUG AUCGAAAGAU CAGCUAAUAC CGCAUACG

Se han descrito también composiciones para la amplificación de los ácidos nucleicos de *Neisseria* que contienen un híbrido de ácido nucleico formado entre un ácido nucleico de *Neisseria* y un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo formado por:

SEQ ID NO: 5 GTCCCCTGCT TTCCCTCTCA AGAC

SEQ ID NO: 6 GGCGAGTGGC GAACGGGTGA GTAACATA

SEQ ID NO: 41 GUCCCCUGCU UUCCCUCUCA AGAC

SEQ ID NO: 8 GTTAGCCGGT GCTTATTCTT CAGGTACCGT CATCG

SEQ ID NO: 44 GUUAGCCGGU GCUUAUUCUU CAGGUACCGU CAUCG

SEQ ID NO: 10 GAAGGCCTTC GGGTTGTAAA GGAC

SEQ ID NO: 46 GAAGGCCUUC GGGUUGUAAA GGAC

G. Métodos de ensayo

La presente invención contempla varios métodos para el ensayo de detección de la presencia de ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoeae* dentro de una muestra. Un experto en la técnica comprende que las condiciones exactas de ensayo, las sondas o cebadores empleados variarán en función del formato particular de ensayo empleado y la fuente de la muestra.

También se describen métodos para la detección de la presencia de *Neisseria meningitidis* mediante el contacto de una muestra de ensayo en condiciones restrictivas de hibridación con una sonda de ensayo de hibridación de ácido nucleico capaz de hibridar preferentemente en condiciones restrictivas de ensayo de hibridación con un ácido nucleico diana de *Neisseria meningitidis* ignorando los ácidos nucleicos de *Neisseria gonorrhoeae*, teniendo dicho ácido nucleico diana una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a las secuencias seleccionadas del grupo formado por:

ES 2 281 077 T3

SEQ ID NO: 11 GGCTGTTGCT AATATCAGCG

SEQ ID NO: 12 GGCTGTTGCT AATACCAGCG

5

SEQ ID NO: 15 CGCTGATATT AGCAACAGCC

SEQ ID NO: 16 CGCTGGTATT AGCAACAGCC

10

SEQ ID NO: 25 GGCUGUUGCU AAUAUCAGCG

SEQ ID NO: 26 GGCUGUUGCU AAUACCAGCG

15

SEQ ID NO: 27 CGCUGAUUU AGCAACAGCC

SEQ ID NO: 28 CGCUGGUAUU AGCAACAGCC

20

Otros métodos para la detección de la presencia de *Neisseria meningitidis* incluyen el paso de poner en contacto una muestra de ensayo en condiciones restrictivas del ensayo de hibridación, con una sonda de ensayo de hibridación de ácido nucleico capaz de hibridar de preferencia en condiciones restrictivas de hibridación con una secuencia diana de ácido nucleico de *Neisseria meningitidis* ignorando las secuencias de ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoeae*, correspondiendo substancialmente dicha secuencia diana de ácido nucleico con una secuencia seleccionada del grupo formado por

25

SEQ ID NO: 11 GGCTGTTGCT AATATCAGCG

30

SEQ ID NO: 12 GGCTGTTGCT AATACCAGCG

SEQ ID NO: 15 CGCTGATATT AGCAACAGCC

35

SEQ ID NO: 16 CGCTGGTATT AGCAACAGCC

Los métodos de la presente invención para la detección de la presencia de la *Neisseria gonorrhoeae* están descritos en las reivindicaciones 34-37. Otros métodos descritos en la presente incluyen el paso de poner en contacto una muestra de ensayo en condiciones restrictivas de hibridación con una sonda de ensayo de hibridación de ácido nucleico capaz de hibridar preferentemente en condiciones restrictivas de ensayo de hibridación, con una secuencia de ácido nucleico diana de *Neisseria gonorrhoeae* ignorando una secuencia de ácido nucleico de *Neisseria meningitidis*, correspondiendo substancialmente dicha secuencia diana de ácido nucleico a una secuencia seleccionada del grupo formado por

40

SEQ ID NO 1: GAACGTACCG GGTAGCGG

45

SEQ ID NO 29: CCGCTACCCG GTACGTTC

50

SEQ ID NO 31: GAACGUACCG GGUAGCGG

SEQ ID NO 33: CCGCUACCCG GUACGUUC

55

Se han descrito también métodos para la detección de la presencia de microorganismos de *Neisseria gonorrhoeae* poniendo en contacto una muestra de ensayo en condiciones restrictivas de hibridación con una sonda de ensayo de hibridación de ácido nucleico capaz de hibridar preferentemente en condiciones restrictivas de ensayo de hibridación, con una secuencia de ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoeae* ignorando las secuencias de ácido nucleico de *Neisseria meningitidis*, correspondiendo substancialmente dichas secuencias diana de ácido nucleico a una secuencia seleccionada del grupo formado por:

60

SEQ ID NO 1: GAACGTACCG GGTAGCGG

65

SEQ ID NO 31: GAACGUACCG GGUAGCGG

ES 2 281 077 T3

Se describen también métodos de detección de *Neisseria* amplificando en primer lugar una porción de ácido nucleico de *Neisseria* y a continuación empleando opcionalmente una sonda de ensayo de hibridación para detectar la presencia de un ácido nucleico específico derivado de *Neisseria* amplificado mediante cebadores. El ácido nucleico amplificado puede detectarse mediante un número de métodos incluyendo la electroforesis sobre gel.

Se han descrito también métodos de detección de ácido nucleico derivado de *Neisseria*, amplificando en primer lugar dicho ácido nucleico con por lo menos un oligonucleótido de amplificación que unirá a, o causará un alargamiento mediante una o más de las siguientes secuencias:

SEQ ID NO: 47 GUCUUGAGAG GGAAAGCAGG GGAC

SEQ ID NO: 48 UAUGUUACUC ACCCGUUCGC CACUCGCC

SEQ ID NO: 49 CUGAAGAAUA AGCACCGGCU AACUACGUGC AGCAGC

SEQ ID NO: 50 CGAUGACGGU ACCUGAAGAA UAAGCACCGG CUAAC

SEQ ID NO: 51 AACGGCCUUU UCUUCCUGA CAAAAGUCCU UUACAACCCG

SEQ ID NO: 52 GUCCUUACA ACCCGAAGGC CUUC

en donde dicho oligonucleótido de amplificación tiene opcionalmente una secuencia de ácido nucleico reconocida por una ARN polimerasa o la cual potencia la iniciación del alargamiento por una ARN polimerasa.

Este primer paso del método es seguido a continuación opcionalmente por la detección del ácido nucleico amplificado en el paso de amplificación con una sonda de ensayo de hibridación de oligonucleótidos capaz de hibridar específicamente con ácidos nucleicos derivados de *Neisseria species*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria meningitidis* ó *Neisseria gonorrhoeae* en condiciones restrictivas de hibridación.

El oligonucleótido de amplificación empleado en los métodos de la presente invención puede tener opcionalmente una secuencia de ácido nucleico por ejemplo, una secuencia promotora, reconocida por una ARN polimerasa o la cual potencia la iniciación mediante una ARN polimerasa.

También se describe un método para la amplificación de los ácidos nucleicos de *Neisseria* en una muestra de ensayo mediante la amplificación del ácido nucleico con uno o más oligonucleótidos de amplificación que se unirán o causarán un alargamiento a través de la secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a las siguientes secuencias de nucleótidos:

SEQ ID NOS: 19 ó 49,

SEQ ID NOS: 21 ó 50, ó

con un segundo oligonucleótido de amplificación que se unirá o causará un alargamiento a través de una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una de las siguientes secuencias:

SEQ ID NOS: 20 ó 51,

SEQ ID NOS: 22 ó 52, ó ambos dichos oligonucleótidos de amplificación, en donde por lo menos uno de dichos oligonucleótidos de amplificación tiene opcionalmente una secuencia de ácido nucleico reconocida por una ARN polimerasa o el cual potencia la iniciación o alargamiento mediante una ARN polimerasa.

En otras versiones más preferidas, la presente invención contempla un método para la amplificación de los ácidos nucleicos derivados de la *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra de ensayo que comprende la amplificación de dicho ácido nucleico con uno o más oligonucleótidos de amplificación que se unirán a, o causarán el alargamiento a través de una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente con una de las siguientes secuencias de nucleótidos:

SEQ ID NOS: 19 ó 49, ó

con un segundo oligonucleótido de amplificación que se unirá a, o causará el alargamiento a través de una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a las siguientes secuencias:

ES 2 281 077 T3

SEQ ID NOS: 20 ó 51, o ambos dichos oligonucleótidos de amplificación, en donde por lo menos uno de dichos oligonucleótidos de amplificación tiene opcionalmente una secuencia de ácido nucleico reconocida por una ARN polimerasa, o la cual potencia la iniciación o alargamiento mediante una ARN polimerasa.

5 Se describe también un método para aumentar el número de secuencias de ácido nucleico derivado de *Neisseria* en una muestra de ensayo que comprende la amplificación de dicho ácido nucleico con uno o más oligonucleótidos de amplificación que se unirán a, o causarán el alargamiento a través de una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a las siguientes secuencias de nucleótidos:

10 SEQ ID NOS: 21 ó 50

o con un segundo oligonucleótido de amplificación que se unirá a, o causará el alargamiento a través de una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a las siguientes secuencias:

15 SEQ ID NOS: 22 ó 52, ó ambos dichos oligonucleótidos de amplificación, en donde por lo menos uno de dichos oligonucleótidos de amplificación tiene opcionalmente una secuencia de ácido nucleico reconocida por una ARN polimerasa, o la cual potencia la iniciación o alargamiento mediante una ARN polimerasa.

20 Los métodos de más arriba pueden incluir también otro paso de detección del ácido nucleico amplificado con una sonda de ensayo de hibridación de oligonucleótidos capaz de hibridar específicamente con los ácidos nucleicos de la *Neisseria meningitidis* en condiciones restrictivas de hibridación.

25 Específicamente, los métodos pueden detectar la *Neisseria meningitidis* empleando sondas de ensayo de hibridación de oligonucleótidos los cuales hibridarán en condiciones restrictivas de hibridación con una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una secuencia seleccionada del grupo formado por:

SEQ ID NO: 11 GGCTGTTGCT AATATCAGCG

30 SEQ ID NO: 27 CGCUGAUUU AGCAACAGCC

SEQ ID NO: 12 GGCTGTTGCT AATACCAGCG

35 SEQ ID NO: 28 CGCUGGUUU AGCAACAGCC

SEQ ID NO: 15 CGCTGATATT AGCAACAGCC

40 SEQ ID NO: 25 GGCUGUUGCU AAUAUCAGCG

SEQ ID NO: 16 CGCTGGTATT AGCAACAGCC

45 SEQ ID NO: 26 CGCUGUUGCU AAUACCAGCG

50 Se han descrito también métodos para aumentar el número de ácidos nucleicos derivados de *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra de ensayo mediante la amplificación de dicho ácido nucleico con uno o más oligonucleótidos de amplificación que se unirán a, o causarán el alargamiento a través de una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos:

SEQ ID NOS: 23 ó 47

55 SEQ ID NOS: 24 ó 48

y en donde el oligonucleótido de amplificación tiene opcionalmente una secuencia de ácido nucleico reconocida por una ARN polimerasa, o la cual potencia la iniciación o alargamiento mediante una ARN polimerasa.

60 También se describen métodos adicionales para la amplificación de los ácidos nucleicos derivados de la *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra de ensayo con un primer oligonucleótido de amplificación que se unirá a, o causará el alargamiento a través de una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una de las siguientes secuencias de nucleótidos

65 SEQ ID NOS: 23 ó 47 ó

con un segundo oligonucleótido de amplificación que se unirá a, o causará el alargamiento a través de una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una de las siguientes secuencias:

ES 2 281 077 T3

SEQ ID NOS: 24 ó 48, ó

5 tanto con el primero como con el segundo oligonucleótido de amplificación, en donde uno de los oligonucleótidos de amplificación tiene opcionalmente una secuencia de ácido nucleico reconocida por una ARN polimerasa, o la cual potencia la iniciación o alargamiento mediante una ARN polimerasa.

10 Estos métodos de amplificación del ácido nucleico derivado de la *Neisseria gonorrhoeae* pueden ir seguidos por el paso de detección del ácido nucleico amplificado con una sonda de ensayo de hibridación de oligonucleótidos capaz de hibridar específicamente con los ácidos nucleicos de la *Neisseria gonorrhoeae* en condiciones restrictivas de hibridación.

De preferencia, la sonda de ensayo de hibridación de oligonucleótidos tiene una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente con una secuencia seleccionada del grupo formado por:

15 SEQ ID NOS: 1, 29, 31, y 33.

La detección del ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoeae* puede incluir el empleo de un oligonucleótido auxiliar que tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo formado por:

20 SEQ ID NO: 2, y

SEQ ID NO: 39

25 Otros métodos de detección del ácido nucleico de la *Neisseria gonorrhoeae* son contemplados en la presente invención mediante el aumento del número de ácidos nucleicos derivados de la *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra de ensayo mediante la amplificación de dicho ácido nucleico con uno o más oligonucleótidos de amplificación que se unirán a, o causarán el alargamiento a través de una secuencia de ácido nucleico substancialmente correspondiente a una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos: SEQ ID NOS: 19 ó 49, SEQ ID NOS: 20 ó 51, y en donde
30 el oligonucleótido de amplificación tiene opcionalmente una secuencia de ácido nucleico reconocida por una ARN polimerasa, o la cual potencia la iniciación o alargamiento por una ARN polimerasa.

Otros métodos para la amplificación de los ácidos nucleicos de *Neisseria* en una muestra de ensayo descritos en la presente incluyen la amplificación del ácido nucleico con uno o más oligonucleótidos de amplificación que se unirán
35 a, o causarán el alargamiento a través de una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una de las secuencias de nucleótidos siguientes:

SEQ ID NOS: 19 ó 49, ó

40 con un segundo oligonucleótido de amplificación que se unirá a, o causará el alargamiento a través de una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una de las siguientes secuencias:

SEQ ID NOS: 20 ó 51, ó

45 tanto con el primero como con el segundo oligonucleótido de amplificación.

Alternativamente, se describe además la amplificación de los ácidos nucleicos de *Neisseria* en una muestra de ensayo que comprende la amplificación del ácido nucleico con uno o más oligonucleótidos de amplificación que se unirán a, o causarán el alargamiento a través de una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a
50 una de las siguientes secuencias de nucleótidos:

SEQ ID NOS: 21 ó 50, ó

55 con un segundo oligonucleótido de amplificación que se unirá a, o causará el alargamiento a través de una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una de las siguientes secuencias:

SEQ ID NOS: 22 ó 52, ó

60 con ambos dichos primero y segundo oligonucleótidos de amplificación.

La amplificación del ácido nucleico de *Neisseria* va seguida de preferencia por la detección del ácido nucleico amplificado con una sonda de ensayo de hibridación de oligonucleótidos capaz de hibridar específicamente con los ácidos nucleicos de la *Neisseria gonorrhoeae* en condiciones restrictivas de hibridación. La sonda de ensayo de hibridación de oligonucleótidos empleada de preferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente
65 con una secuencia seleccionada del grupo formado por:

SEQ ID NOS: 3, 32, 30, 34

H. *Sistemas de diagnóstico*

La presente invención contempla también los sistemas de diagnóstico en forma de kit, como se reivindica en las reivindicaciones 16-31. Un sistema de diagnóstico de la presente invención puede incluir un kit que contiene, en una cantidad suficiente para por lo menos un ensayo, los cebadores de amplificación y/o las sondas de ensayo de hibridación de la presente invención en un material de envase. Típicamente los kits incluirían instrucciones para el empleo de los cebadores y/o sondas envasados.

Los varios componentes del sistema de diagnóstico pueden suministrarse en diferentes formas. Por ejemplo, las enzimas, los nucleótido trifosfatos, los cebadores y las sondas necesarias pueden proporcionarse en forma de un reactivo liofilizado. Estos reactivos liofilizado pueden ser mezclados previamente antes de la liofilización, de forma que cuando se reconstituyen forman una mezcla completa, con la proporción exacta de cada uno de los componentes, lista para ser usada en el ensayo. Además, los sistemas de diagnóstico de la presente invención pueden contener un reactivo de reconstitución para la reconstitución de los reactivos liofilizados del kit. En los kits preferidos, las enzimas, los nucleótidos, los trifosfatos y los cofactores necesarios para las enzimas se suministran como un reactivo liofilizado único que cuando se reconstituye forma un reactivo adecuado para emplear en los presentes métodos. En estos kits preferidos, también puede suministrarse un agente cebador liofilizado. En otros kits preferidos, se suministran reactivos sonda liofilizados.

Los materiales de envase típicos incluyen matrices sólidas como p. ej., vidrio, plástico, papel, láminas, micro-partículas y similares, capaces de soportar dentro de límites fijos la sonda de ensayo de hibridación o el cebador de amplificación de la presente invención. Así por ejemplo, un envase obtenido a partir de materiales de envasado puede ser un vial de vidrio empleado para contener cantidades de submiligramos (es decir, picogramos, nanogramos, etc) de un cebador dado o de una sonda de ensayo de hibridación, o puede ser un pocillo de una placa de microtitulación al cual las sondas y/o los cebadores han sido operativamente fijados, es decir, unidos de forma que son capaces de participar en un método de detección de la presente invención.

Las instrucciones de empleo incluyen típicamente una exposición suficiente describiendo los varios reactivos y/o concentraciones de los reactivos y por lo menos un parámetro del método de ensayo el cual por ejemplo podría ser las cantidades relativas de reactivos a emplear por cantidad de muestra. Además, pueden también incluirse especificaciones como mantenimiento, períodos de tiempo, temperatura y condiciones tampón.

La presente invención contempla sistemas de diagnóstico o kits que contienen los oligonucleótidos de una composición de la presente invención. La presente invención contempla también sistemas de diagnóstico o kits que contienen los oligonucleótidos necesarios para efectuar un método de la presente invención.

Este método emplea también de preferencia un oligonucleótido auxiliar que tiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo formado por:

SEQ ID NO. 4: y

SEQ ID NO. 40:

La presente invención contempla sistemas de diagnóstico o un kit como se describe en las reivindicaciones 16-31. Otros sistemas de diagnóstico o un kit contiene(n) por lo menos un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que substancialmente corresponde con una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo formado por:

SEQ ID NOS: 1, 11, 12, 15, 16, 29, 33, 27, 28, 25, 26.

La presente invención contempla sistemas de diagnóstico o un kit que tiene una sonda de ensayo de hibridación de nucleótidos que tiene por lo menos una sonda auxiliar como se describe en las reivindicaciones 29-31. Otras sondas auxiliares tienen una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente con la secuencia seleccionada del grupo formado por:

SEQ ID NOS: 2 ó 39

cuando dicho oligonucleótido corresponde substancialmente a

SEQ ID NOS: 1 ó 31;

ó

SEQ ID NOS: 13 ó 35, ó

SEQ ID NOS: 14 ó 36,

ES 2 281 077 T3

cuando dicho oligonucleótido corresponde substancialmente a

SEQ ID NOS: 11 ó 25, ó

5 SEQ ID NOS: 12 ó 26,

ó

SEQ ID NOS: 17 ó 37,

10 SEQ ID NOS: 18 ó 38,

cuando dicho oligonucleótido corresponde substancialmente a

15 SEQ ID NOS: 15 ó 27, ó

SEQ ID NOS: 16 ó 28.

20

La presente invención contempla sistemas de diagnóstico o un kit, como se describe en las reivindicaciones 16-31. Otros sistemas de diagnóstico o el kit contienen dos oligonucleótidos que tienen una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo formado por:

25

SEQ ID NO: 8 GTTAGCCGGT GCTTATTCTT CAGGTACCGT CATCG

30 SEQ ID NO: 10 GAAGGCCTTC GGGTTGTAAA GGAC

SEQ ID NO: 44 GUUAGCCGGU GCUUAUUCUU CAGGUACCGU CAUCG

35 SEQ ID NO: 46 GAAGGCCUUC GGGUUGUAAA GGAC

conteniendo opcionalmente una secuencia 5' reconocida mediante una ARN polimerasa o la cual potencia la iniciación o alargamiento mediante una ARN polimerasa.

40

La presente invención contempla sistemas de diagnóstico o kits como se describe en las reivindicaciones 16-31. Otros métodos de diagnóstico o kits descritos en la presente contiene(n) oligonucleótidos que tienen una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a las siguientes secuencias:

45 SEQ ID NOS: 7 ó 43,

SEQID NOS: 9 ó 45,

SEQID NOS: 11 ó 25,

50 SEQ ID NOS: 13 ó 35,

SEQ ID NOS: 14 ó 36.

55

Se describen también sistemas de diagnóstico o kits que contienen oligonucleótidos que tienen una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a las siguientes secuencias:

SEQ ID NOS: 15 ó 27,

60 SEQID NOS: 16 ó 26,

SEQ IDNOS: 17 ó 37,

65 SEQ ID NOS: 18 ó 38.

ES 2 281 077 T3

Se describen también sistemas de diagnóstico o un kit conteniendo oligonucleótidos que tienen una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a las siguientes secuencias:

5 SEQ ID NOS: 7 ó 43,

SEQ ID NOS: 9 ó 45,

SEQ ID NOS: 15 ó 27,

10 SEQ ID NOS: 16 ó 28,

SEQ ID NOS: 17 ó 37,

15 SEQ ID NOS: 18 ó 38.

Se describen también, sistemas de diagnóstico o un kit que contienen oligonucleótidos que tienen una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a las siguientes secuencias:

20 SEQ ID NOS: 5 ó 41,

SEQ ID NOS: 6 ó 42,

25 SEQ ID NOS: 2 ó 39,

SEQ ID NOS: 1 ó 31.

Se describe también un sistema de diagnóstico o un kit que contienen oligonucleótidos que tienen una secuencia de ácido nucleico que corresponde substancialmente a las siguientes secuencias:

30 SEQ ID NOS: 5 ó 41,

SEQ ID NOS: 2 ó 39,

35 SEQ ID NOS: 1 ó 31.

Ejemplos

40 A continuación se describen unos ejemplos para ilustrar diferentes aspectos y versiones de la presente invención. Estos ejemplos no pretenden de ninguna manera limitar la invención descrita, la cual está limitada solamente por las reivindicaciones.

45 Las sondas específicas para la *Neisseria meningitidis* se diseñaron empleando secuencias determinadas en áreas diana prospectivas empleando cebadores complementarios a los ARNr de 16S de *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC NO. 19424), *Neisseria meningitidis* serogrupo A (ATCC NOs 13077), serogrupo C (ATCC No 23248) y serogrupo L (ATCC No. 43828), y aislados clínicos, *Neisseria lactamica* (ATCC NO. 23970), *Neisseria cinerea* (ATCC NO. 14685), *Neisseria mucosa* (ATCC NO. 19696), *Neisseria sicca* (ATCC NO. 29193) y *Kingella kingae* (ATCC NO. 23330). La secuencia de ácido nucleico de los vecinos filogenéticamente próximos, incluyendo la secuencia publicada de *Neisseria gonorrhoeae* NCTC 8375 Rossau *et al.*, Nuc. Acids Res. 16:6227 fueron también empleados como comparaciones con la secuencia nucleica de la *Neisseria meningitidis* para determinar regiones variables.

55 A continuación, se describe un ejemplo de dicho alineamiento: una secuencia específica en la cual la *Neisseria meningitidis* derivada de la *E. coli* y la *Neisseria gonorrhoeae* se escogieron para el diseño de la sonda. Dos diferentes sondas fueron diseñadas para la *Neisseria meningitidis* (SEQ ID NO: 11) y (SEQ ID NO: 12). Las secuencias de ARN se muestran a continuación:

60 *E. coli*

GAGUAAAG (UUAUAC) CUUUG

SEQ ID NO: 54

GGCTGTTG (CTAATAC) CAGCG

SEQ ID NO: 12

GGCTGTTG (CTAATAT) CAGCG

SEQ ID NO: 11

65 *N.meningitidis.c*

GGCUGUUG (CUAAUAU) CAGCG

SEQ ID NO: 55

N.gonorrhoeae.P

GGCUGUUG (CCAAUAU) CGGGG

SEQ ID NO: 56

ES 2 281 077 T3

Las siguientes secuencias de sonda de ensayo de hibridación figuran en los ejemplos que se describen más adelante:

- SEQ ID NO: 1 GAACGTACCGGGTAGCGG,
 5 SEQ ID NO: 3 GCCAATATCGGCGGCCGATG,
 SEQ ID NO: 11 GGCTGTTGCTAATATCAGCG,
 10 SEQ ID NO: 12 GGCTGTTGCTAATACCAGCG,
 SEQ ID NO: 15 CGCTGATATTAGCAACAGCC, y
 15 SEQ ID NO: 16 CGCTGGTATTAGCAACAGCC

Ejemplo 1

En este experimento, el ARNr de *N. gonorrhoeae*, purificado (ATCC NO. 19424), se amplificó con oligonucleótidos conteniendo secuencias complementarias al ARNr de *N. gonorrhoeae* empleando las técnicas descritas en Kacian *et al.*, U.S. patente n° 5.399.491. Se sintetizaron dos cebadores promotores conteniendo cada uno, una secuencia promotora T7 ARN polimerasa 5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3' SEQ ID NO. 53 en el extremo 5', unida covalentemente a una secuencia diana complementaria 5'-GTCCCCTGCTTTCCCTCTCAAGAC,3' (SEQ ID NO. 5) en el extremo 3'. Se sintetizó un cebador promotor con un grupo libre 3' OH, y se empleó con dos pmoles por reacción. El segundo cebador promotor se sintetizó con un grupo alciano diol en el extremo 3' y se empleó con 13 pmoles por reacción. El ácido nucleico diana y los cebadores se calentaron a 95°C durante 15 minutos y se enfriaron a 42°C. Se añadieron transcriptasa inversa del virus de la leucemia del ratón Moloney (MMLV RT), 900 unidades, y 400 unidades de T7 ARN polimerasa. La mezcla de amplificación final contenía 50 mM de Tris HCl (pH 8,5), 35 mM de cloruro de potasio, 4 mM de GTP, 4 mM de ATP, 4 mM de UTP, 4 mM de CTP, 1 mM de dATP, 1 mM de dTTP, 1 mM de dCTP, 1 mM de dGTP, 20 mM de MgCl₂, 20 mM de N-acetil-L-cisteína, y 5% (p/v) de glicerina. Después de dos horas de incubación a 42°C, se ensayó la reacción completa de amplificación de un centenar de μ l, mediante hibridación con una sonda marcada con éster de acridinio, con la secuencia 5'-GAACGTACCGGGTAGCGG-3' (SEQ. ID. NO. 1) y una sonda auxiliar sin marcar, de secuencia 5'-GGGATAACTGATCGAAAGATCAGCTAATACCGCA TACG-3' (SEQ. ID. NO. 2). La hibridación se efectuó en 200 μ l de una solución que contenía 0,05 M de succinato de litio (pH 5), 0,6 M de LiCl, 1% (w/v) de laurilsulfato de litio, 10 mM de EDTA, 10 mM de EGTA, a 60°C durante 10 minutos, seguido de la adición de 300 μ l de tetraborato de sodio 0,15 M, pH 8,5, 1% de TRITON® X-100. Esta mezcla se incubó a 60°C durante 10 minutos, y se enfrió a temperatura ambiente. Se determinó la quimioluminiscencia que quedó en cada tubo con un luminómetro Gen-Probe LEADER® I equipado con inyección automática de ácido nítrico 1 mM y 0,1% (v/v) de peróxido de hidrógeno seguido de la inyección de una solución conteniendo hidróxido de sodio 1 N. Los resultados se dieron en Unidades Relativas de Luz (RLU), una medida de los fotones detectados por el luminómetro.

TABLA 1

Amplificación del ácido nucleico de la Neisseria gonorrhoeae con oligonucleótidos de amplificación que comprenden la SEQ ID NO. 5, seguida de la detección con una sonda que contiene SEQ ID NO. 1

Cantidad de diana	RLU
0,1 pg*	103.596
	99.931
	123.512
0,025 pg	25.636
	39.454
	29.594
0 pg	1.084
	1.012
	640

* pg = picogramo

ES 2 281 077 T3

Ejemplo 2

Este experimento demuestre la amplificación del ARNr de *N. gonorrhoeae* con dos cebadores de sentido opuesto. El cebador promotor descrito en el ejemplo 1 que contiene una secuencia promotora de T7 ARN polimerasa y una región 3' de hibridación diana de secuencia 5'-GTCCCCTGCTTTCCCTCTCAAGAC-3' (SEQ. ID. NO. 5) se empleó con 15 pmoles por reacción y un cebador conteniendo una secuencia del mismo sentido que el ARNr de la *N. gonorrhoeae*, 5'-GGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACATA-3' (SEQ. ID. NO. 6) se empleó con 15 pmoles por reacción. Las reacciones se efectuaron por triplicado. Las condiciones de reacción fueron las descritas en el ejemplo 1, y las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos y a continuación se enfriaron a 42°C. Se añadieron las enzimas y después de dos horas de incubación a 42°C, se ensayaron 20 µl de la reacción de amplificación mediante hibridación con una sonda marcada con éster de acridinio sintetizada con la secuencia SEQ. ID. NO. 1 y una sonda auxiliar sin marcar sintetizada con la secuencia SEQ. ID. NO. 2. Los cebadores amplificaron el ARN de la *N. gonorrhoeae* y permitieron la detección de menos de 100 copias de la diana.

TABLA 2

Amplificación del ARNr de la N. gonorrhoeae con cebadores que comprenden la SEQ. ID. NOs. 5 y 6, y detección con una sonda conteniendo la SEQ. ID. NO. 1

Cantidad de ARNr diana añadida	RLU
500 copias (0,0012 pg)	334.838
	343.107
	1.320.194
80 copias (0,0002 pg)	255.898
	1.512.486
	377.938
0 pg	2.354
	2.454
	2.440

Ejemplo 3

En este experimento, se usaron de nuevo, dos cebadores promotores de idéntica secuencia. Cada cebador promotor se sintetizó con una secuencia promotora de 5' T7 ARN polimerasa, la 5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGA GA-3' SEQ ID NO: 53 en el extremo 5' y una región 5'-GCTGCTGCACGTAGT-TAGCCGGTGCTTATTCTT CAG-3' (SEQ ID NO. 7) en el extremo 3'. Los cebadores promotores fueron sintetizados o bien con un grupo 3'-hidroxilo y empleando 2 pmoles por reacción, o bien con un > 3'-alcanodiol empleando 13 pmoles por reacción. Se calentaron muestras a 95°C durante 5 minutos y se enfriaron a 42°C antes de la adición de la enzima. Las condiciones de amplificación fueron las que se han descrito en el ejemplo 1. Después de dos horas de incubación a 42°C, se ensayaron 100 µl de la reacción de amplificación mediante hibridación con una sonda marcada con éster de acridinio sintetizada con la secuencia 5'-GCCAATATCGGCGCCGATG-3' (SEQ ID NO. 3) y una sonda auxiliar sin marcar, con la secuencia 5'-ACGGTACCTGGAATAAGCACCGGCTAACTACGTG-3' (SEQ ID NO. 4) empleando las condiciones descritas en el ejemplo 1.

ES 2 281 077 T3

TABLA 3

Amplificación del ARNr de *N. gonorrhoeae* empleando cebadores que comprenden la SEQ ID NO. 7

Cantidad de ARNr diana añadida	RLU con sonda SEQ ID NO. 3
0,025 pg	95.905
	49.717
	59.774
0,0125 pg	10.520
	12.576
	12.322
0,005 pg	19.498
	40.962
	21.722
0 pg	2.888
	2.792
	2.777

Ejemplo 4

En este experimento, se amplificó el ARNr de *N. gonorrhoeae* con una mezcla de dos oligonucleótidos, uno de ellos un cebador promotor complementario de ARNr de *N. gonorrhoeae*, y el otro un cebador del mismo sentido que el ARNr de *N. gonorrhoeae*. El cebador promotor contenía una secuencia promotora T7 ARN polimerasa en el extremo 5' y una región de hibridación diana 5'-GCTGCTGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCAG-3' (SEQ. ID. NO. 7) en el extremo 3' y se empleó con un cebador de secuencia 5'-CGGGTTGTAAAGGACTTTTGTCAGGGAAGAAAAGGCCGTT-3' (SEQ. ID. NO. 9) con 30 pmoles por reacción. Alternativamente, se empleó un cebador promotor conteniendo una región de hibridación diana, de secuencia 5'-GTTAGCCGGTGCTTATTCTTCAGGTACCGTCATCG-3' (SEQ. ID. NO. 8), con 15 pmoles por reacción con el cebador promotor con una secuencia de 5'-GAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGGAC-3' (SEQ ID NO. 10), con 15 pmoles por reacción. Las condiciones de la amplificación fueron como las descritas en el ejemplo 1. Se ensayaron veinte μ l del producto mediante hibridación con una sonda marcada con éster de acridinio sintetizada con la secuencia 5'-GCCAATATCGGCGGCCGATG-3' (SEQ. ID. NO. 3) y una sonda auxiliar sin marcar sintetizada con la secuencia 5'-ACGGTACCTGAAGAA TAAGCACCGGCTAACTACGTG-3' (SEQ. ID. NO. 4) como se describe en el ejemplo 1.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 281 077 T3

TABLA 4

Amplificación del ARNr de N. gonorrhoeae empleando cebadores que comprenden SEQ ID Nos 7 y 9 ó 8 y 10

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Cantidad de ARNr diana añadido	RLU con sonda	
	SEQ ID NO. 3	
Secuencias de los cebadores	SEQ ID NOS.	SEQ ID NOS.
	7 y 9	8 y 10
0,5 pg	817.344	680.836
	802.901	603.811
	785.206	619.969
0,05 pg	188.661	132.359
	192.656	157.509
	204.878	87.161
0,005 pg	25.276	51.398
	26.451	40.032
	24.915	55.968
0 pg	3.600	2.189
	3.366	2.205
	888	

Ejemplo 5

50

55

60

65

Este ejemplo demuestra la reactividad del ensayo de amplificación y detección. Se suspendieron cultivos recién preparados de trece cepas de *N. gonorrhoeae* en 0,9% de cloruro de sodio a una densidad de aproximadamente 10^{10} células/ml y se lisaron en una solución conteniendo 3% (p/v) de lauril sulfato de litio, 30 mM de fosfato de sodio pH 6,8, 1 mM de EDTA y 1 mM de EGTA. La liberación del ácido nucleico se confirmó mediante hibridación con una sonda dirigida a la región conservada del ARN ribosómico de todas las bacterias. Los lisados de células se diluyeron a continuación en agua y se añadieron a las reacciones de amplificación conteniendo 30 pmoles de un cebador-promotor conteniendo un promotor de 5' T7 ARN de secuencia SEQ ID NO: 53 5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGG AGA-3' y una secuencia de unión diana que comprende SEQ. ID. NO. 7, y 30 pmoles del cebador que comprende la secuencia SEQ. ID. NO. 9. Se efectuaron reacciones duplicadas conteniendo el lisado de por lo menos 10^5 células empleando una mezcla de amplificación conteniendo 50 mM de Tris HCl (pH 8,5), 35 mM de cloruro de potasio, 4 mM de GTP, 4 mM de ATP, 4 mM de UTP, 4 mM de CTP, 1 mM de dATP, 1 mM de dTTP, 1 mM de dCTP, 1 mM de dGTP, 20 mM de $MgCl_2$, 20 mM de N-acetil-L-cisteína, 5% (v/v) de glicerina y los cebadores oligonucleótidos descritos más arriba. La mezcla se calentó a 95°C durante 5 minutos, se enfrió a 42°C y se añadieron 900 unidades de MMLV transcriptasa inversa y 400 unidades de T7 ARN polimerasa. Después de una hora de incubación a 42°C, se ensayaron 20 μ l de reacción de amplificación mediante hibridación con una sonda marcada con éster de acridinilo sintetizada con la secuencia 5'-GCCAATATCGGCGGCCGATG-3' (SEQ. ID. NO. 3) y una sonda auxiliar sin marcar conteniendo la secuencia 5'-ACGGTACCTGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTG-3' (SEQ. ID. NO. 4).

ES 2 281 077 T3

TABLA 5

Amplificación de diferentes cepas de N. gonorrhoeae empleando cebadores que comprenden SEQ ID Nos. 7 y 9

5	<u>N. gonorrhoeae</u> ATCC n°	RLU con sonda SEQ ID NO. 3
10	9793	1.150.477
		1.162.284
15	9826	1.173.586
		1.149.251
20	9827	1.093.440
		1.080.405
25	9828	1.143.960
		1.149.465
30	9830	1.165.108
		1.143.063
35	10150	1.105.754
		1.131.598
40	10874	1.139.487
		1.103.912
45	11688	1.024.195
		1.112.160
50	11689	1.141.404
		1.116.069
55	19424	1.104.256
		1.116.832
60	27628	1.133.696
		1.117.624
65	27630	1.132.496
		1.146.161
	27631	1.089.105
		1.070.058

Ejemplo 6

El análisis de la secuencia de otras especies de *Neisseria* indicó que los oligonucleótidos de amplificación de esta invención podían amplificar ácidos nucleicos de otras especies. Este ejemplo demuestra la utilidad de los oligonucleótidos de amplificación de esta invención para amplificar el ácido nucleico de otras especies de *Neisseria*, *N. meningitidis*. En el curso del desarrollo de una sonda específica para la *N. meningitidis* se vio claramente que los miembros de las especies *N. meningitidis* no eran homogéneos en la región de la sonda seleccionada. Se determinaron las secuencias de ARNr de 16S de las especies representativas de *N. meningitidis* que mostraron una baja reactividad a la sonda inicial, y se diseñó una segunda sonda. Estos datos demuestran la diferencia de reactividad de las tres especies de *N. meningitidis* a las dos sondas. En este ejemplo, se amplificó ARN purificado de *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC n° 19424), ó lisados de *Neisseria meningitidis* serogrupo A (ATCC n° 13077), serogrupo C (ATCC n° 13102) y serogrupo L (ATCC n° 43828), representando aproximadamente 1.000 células, con un cebador-promotor y el cebador descrito en el ejemplo 5 en las condiciones descritas en el ejemplo 5. Se ensayaron muestras de diez µl de los 100 µl de las reacciones de amplificación, mediante hibridación con una sonda marcada con éster de acridinio sintetizada con la secuencia 5'-GCCAATATCGGCGGCCGATG-3' (SEQ ID NO. 3 y una sonda auxiliar sin marcar sintetizada con la secuencia 5'-ACGGTACCTGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTG-3, (SEQ ID NO. 4), ó una sonda marcada con éster de acridinio sintetizada con la secuencia 5'-GGCTGTTGCTAATATCAGCG-3' (SEQ ID NO. 11) y dos sondas auxiliares sin marcar, una sintetizada con la secuencia 5'-GCCTTCGGGTTGTAAAGGACTTTTGTTCAGGGGAAGA AAA-3' (SEQ ID NO. 13) y la otra sintetizada con la secuencia 5'-GCTGATGACGGTACCTGAAGAATAAG CACCGC-3' (SEQ ID NO. 14), ó una sonda marcada con éster de acridinio sintetizada con la secuencia 5'-GGCTGTTGCTAATACCAGCG-3' (SEQ ID NO. 12) con sondas auxiliares sin marcar SEQ ID NO: 13 Y 14 ó con una combinación de sondas marcadas SEQ ID NO: 11 Y 12 empleadas con sondas auxiliares sin marcar SEQ ID NO: 13 Y 14. El análisis de las secuencias indicó que las otras cepas de *Neisseria* amplificarán también con estos cebadores.

TABLA 6

Amplificación de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* empleando cebadores que comprenden las SEQ ID Nos. 7 y 9

	RLU			
Sonda SEQ ID Nos:	3	11	12	11+12
Sonda auxiliar SEQ ID Nos	4	13+14	13+14	13+14
Organismo				
<i>N. gonorrhoeae</i>	1.017.626 994.788 1.030.242	1.660 1.448 1.743	820 809 805	1.603 1.559 1.792
<i>N. meningitidis</i> Serogrupo A	2.059 1.861 2.183	1.208.967 1.115.956 1.138.675	3.534 3.700 3.546	829.251 760.360 775.675
<i>N. meningitidis</i> Serogrupo C	1.931 2.130 1.963	1.164.254 1.068.489 1.110.933	2.819 2.477 3.103	749.502 687.517 803.732
<i>N. meningitidis</i> Serogrupo L	1.833 1.972 1.814	85.321 79.555 77.797	1.206.045 1.199.815 1.211.022	1.537.314 1.474.016 1.645.742

Los datos muestran que las cepas de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* pueden ser amplificadas empleando cebadores que comprenden las SEQ ID Nos. 7 y 9, y detectadas con las sondas de SEQ ID Nos. 3, 11 y 12.

Ejemplo 7

En este experimento, se demostró la sensibilidad de la amplificación y del ensayo de detección para la *N. meningitidis*. En este ejemplo, se cultivaron células de la *Neisseria meningitidis* serogrupo C, y se suspendieron en 0,9% de cloruro de sodio a una densidad de aproximadamente 10^9 células por ml. Las células se lisaron siguiendo la adición de un volumen igual de una solución conteniendo 3% (p/v) de lauril sulfato de litio, 30 mM de fosfato de sodio (pH 6,8), 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA y se diluyeron con agua antes de la adición a las reacciones de amplificación. Las amplificaciones de efectuaron como se ha descrito en el ejemplo 5 empleando el cebador promotor y el cebador descrito en el ejemplo 5 (SEQ ID Nos. 7 y 9, respectivamente). Se analizaron veinte μ l de la reacción mediante hibridación en el formato HPA empleando una sonda marcada con éster de acridinio sintetizada con la secuencia 5'-GGCTGTTGC TAATATCAGCG-3' (SEQ ID NO. 11) y dos sondas auxiliares sin marcar, una de ellas sintetizada con la secuencia 5'-GCCTTCGGGTTGTAAAGGACTTTTGTTCAGGGAAGAAAA-3' (SEQ ID NO. 13) y la otra sintetizada con la secuencia 5'-GCTGATGACGGTACCTGAAGAATAAGCACCGGC-3' (SEQ ID NO. 14).

TABLA 7

Amplificación de la *N. meningitidis* serogrupo A con oligómeros de amplificación que comprenden las SEQ ID NOS. 7 y 9, seguido de la detección con la sonda SEQ ID NO. 11

Cantidad de diana añadida	RLU con la sonda SEQ ID NO. 11
40 células	723.645
	648.069
	686.492
4 células	195.370
	189.451
	162.128
0,4 células	28.585
	23.253
	824.742
	64.945
0 células	1.432
	1.202
	1.258

Ejemplo 8

Para demostrar la reactividad y especificidad de las sondas dirigidas al ARNr 16S de la *N. meningitidis*, una mezcla de sondas que contienen oligonucleótidos marcados con éster de acridinio, sintetizada con la secuencia 5'-CGCTGA TATTAGCAACAGCC-3', (SEQ ID NO. 15) ó la secuencia 5'-CGCTGGTATTAGCAACAGCC-3', (SEQ ID NO. 16), y sondas auxiliares sin marcar sintetizadas con la secuencia 5'-TTTTCTTCCCTGACAAAAGTCCTTTACAACCC GAAGGC-3' (SEQ ID NO. 17 y 5'-GCCGGTGCTTATTCTTCAGGTACCGTCATCAG-3' (SEQ ID NO. 18), fueron hibridadas con ácido nucleico en lisados preparados a partir de cultivos frescos de *Neisseria* especies relacionados más adelante. Cada lisado se analizó con una sonda dirigida a la región conservada de ARNr 23S para confirmar la lisis del organismo y la integridad del ARNr.

ES 2 281 077 T3

TABLA 8

Reactividad y especificidad de las sondas dirigidas al ARNr de 16S de N. meningitidis

Organismo	ATCC No.	RLU con mezcla de sondas*	RLU con sonda conservada
<u>N. cinerea</u>	14685	736,927	59,831
<u>N. denitrificans</u>	14686	581	50,391
<u>N. elongata</u>	25295	1,511	52,017
<u>N. elongata</u> subespecie <u>glycolytica</u>	29315	618	53,312
<u>N. flavescens</u>	13120	1,316	53,397
<u>N. gonorrhoeae</u>	9793	1,826	62,658
<u>N. gonorrhoeae</u>	9827	753	60,252
<u>N. gonorrhoeae</u>	9830	4,832	58,346
<u>N. gonorrhoeae</u>	10150	1,139	61,573
<u>N. gonorrhoeae</u>	10874	759	58,291
<u>N. gonorrhoeae</u>	11689	4,824	60,039
<u>N. gonorrhoeae</u>	19088	910	53,594
<u>N. gonorrhoeae</u>	19424	851	60,372
<u>N. gonorrhoeae</u>	21824	746	62,153
<u>N. gonorrhoeae</u>	27630	1,829	53,241

ES 2 281 077 T3

TABLA 8 (continuación)

Organismo	ATCC No.	RLU con mezcla de sondas*	RLU con sonda conservada
<u>N. gonorrhoeae</u>	33084	784	62,696
<u>N. gonorrhoeae</u>	35541	431	59,229
<u>N. lactamica</u>	23970	3,497	54,255
<u>N. meningitidis</u> serogrupo A	13077	844,739	54,292
<u>N. meningitidis</u> serogrupo B	23255	722,108	61,439
<u>N. meningitidis</u> serogrupo B	13090	704,890	57,321
<u>N. meningitidis</u> serogrupo B	23251	761,475	58,545
<u>N. meningitidis</u> serogrupo C	13103	770,221	63,704
<u>N. meningitidis</u> serogrupo C	13106	761,099	60,928
<u>N. meningitidis</u> serogrupo C	13102	752,743	62,351
<u>N. meningitidis</u> serogrupo C	13111	711,196	59,635
<u>N. meningitidis</u> serogrupo C	13109	768,874	63,295
<u>N. meningitidis</u> serogrupo C	13110	676,060	58,150
<u>N. meningitidis</u> serogrupo C	13112	543,492	54,921
<u>N. meningitidis</u> serogrupo C	23248	321,600	59,308
<u>N. meningitidis</u> serogrupo D	13113	770,893	56,429
<u>N. meningitidis</u> grupo E	35558	797,072	58,882
<u>N. meningitidis</u> serogrupo L	43828	559,406	61,534
<u>N. meningitidis</u> serogrupo W-135	43744	705,798	62,152
<u>N. meningitidis</u> serogrupo Y	35561	778,600	54,938
<u>N. meningitidis</u> serogrupo Z	35562	749,756	61,793
<u>N. meningitidis</u>	13095	726,612	52,614
<u>N. meningitidis</u>	13101	775,912	59,839
<u>N. meningitidis</u>	13804	785,737	61,790
<u>N. meningitidis</u>	43743	734,400	61,357
<u>N. mucosa</u>	19696	1,560	53,427
<u>N. mucosa</u> subespecie <u>heidelbergensis</u>	25999	1,761	59,306
<u>N. sicca</u>	29193	1,205	58,260
<u>N. sicca</u>	9913	2,203	57,764
<u>N. subflava</u>	14799	2,046	50,832
muestra negativa		5,251	124
		467	132
		1,691	138

* la mezcla de sondas contenía sondas marcadas con éster de acridinio sintetizadas con las secuencias SEQ ID NO. 15 y SEQ ID NO. 16 y sondas auxiliares sin marcar sintetizadas con las secuencias SEQ ID NO. 17 y SEQ ID NO. 18.

Los datos muestran que la mezcla de sondas permitió la detección de todas las cepas de *N. meningitidis* analizadas. La mezcla de sondas mostró una reacción cruzada con la *N. cinerea*, un organismo improbable de ser encontrado en las mismas muestras clínicas que la *N. meningitidis*. El tratamiento de pacientes con infecciones de *N. cinerea* sería el mismo que para los pacientes infectados con *N. meningitidis*.

ES 2 281 077 T3

Ejemplo 9

Este ejemplo demuestra la especificidad del ensayo de amplificación y detección. Treinta pmoles del cebador-promotor comprendiendo la SEQ. ID. NO. 7 y 30 pmoles del cebador comprendiendo la SEQ. ID. NO. 9 se emplearon en el ensayo con once especies diferentes de *Neisseria*. Los lisados celulares se prepararon como se ha descrito en el ejemplo 5 y se amplificaron y analizaron mediante hibridación empleando las condiciones descritas en el ejemplo 1. Veinte microlitros de las reacciones de amplificación se hibridaron con una sonda marcada con éster de acridinio sintetizada con la secuencia 5'-GCCAATATCGGCGGCCGATG-3' (SEQ ID NO. 3) y una sonda auxiliar sin marcar sintetizada con la secuencia 5'-ACGGTACCTGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTG-3' (SEQ ID NO. 4), ó una sonda marcada con éster de acridinio sintetizada con la secuencia 5'GGCTGTTGCTAATATCAGCG-3' (SEQ ID NO. 11) en presencia de sondas auxiliares sin marcar sintetizadas con secuencias comprendiendo SEQ ID NOS. 13 y 14, ó una sonda marcada con éster de acridinio sintetizada con la secuencia 5'-GGCTGTTGCTAATACCAGCG-3' (SEQ ID NO. 12) en presencia de las sondas auxiliares sin marcar SEQ ID NOS. 13 y 14.

TABLA 9

Especificidad de un ensayo empleando la amplificación con oligonucleótidos que comprenden SEQ ID NOS. 7 y 9 seguida por la detección con sondas que comprenden SEQ ID NOS. 3, 11 ó 12

SEQ ID NOS.:	Sonda	Sonda para las regiones conservadas de ARNr bacteriano	RLU		
			11	12	3
	Auxiliares		13+14	13+14	4
Organismo	ATCC No.				
<u>Neisseria cinerea</u>	14685	2,468,721	540,699	1,804	1,633
			609,648	2,484	1,536
			575,050	1,943	1,494
<u>Neisseria denitrificans</u>	14686	2,339,034	740	644	1,563
			659	578	1,539
<u>Neisseria elongata</u>	25295	2,486,745	772	428	1,521
			738	3,297	1,528
<u>Neisseria elongata subspecies glycolytica</u>	29315	2,397,697	697	431	1,443
			954	813	1,528
<u>Neisseria flavescens</u>	13120	2,622,452	780	493	1,547
			874	481	1,610
			969	429	1,589
<u>Neisseria lactamica</u>	23970	2,299,619	736	410	1,621
			839	425	1,544
			1,583	428	1,559
<u>Neisseria mucosa</u>	19696	2,565,699	1,021	981	1,596
			1,408	559	6,781
			851	5,260	1,574
<u>Neisseria mucosa heidelber-gensis</u>	25999	2,927,147	653	367	1,430
			664	390	1,971

ES 2 281 077 T3

5	<u>Neisseria sicca</u>	9913	2,427,561	699	777	1,609
				847	477	1,552
				834	437	1,642
10	<u>Neisseria sicca</u>	29193	2,804,642	954	423	1,588
				615	388	1,505
15	<u>Neisseria gonorrhoeae*</u>	19424	N.T.	3,826	419	586,358
				1,092	411	564,987
				2,390	388	554,134
20	<u>Neisseria meningitidis*</u> Sero- grupo A	13077	N.T.	557,656	1,287	1,492
				621,180	1,009	1,509
				539,592	954	1,617

* ARN purificado empleado a 500 pg por reacción

N.T. = no analizado.

Los datos mostrados en los ejemplos descritos más arriba confirman que los nuevos oligonucleótidos de amplificación descritos en la presente son capaces de amplificar el ácido nucleico de *Neisseria* y pueden emplearse en un análisis para distinguir entre sí la *Neisseria meningitidis* y la *Neisseria gonorrhoeae*, los vecinos filogenéticamente más próximos conocidos. Ninguno de los ejemplos descritos en la presente pretende limitar la presente invención a las versiones de esta descripción, estando limitada dicha invención exclusivamente por las reivindicaciones de más adelante.

REIVINDICACIONES

5 1. Un juego de oligonucleótidos de amplificación útil para la determinación de la presencia de la *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra de ensayo, el cual juego de oligonucleótidos de amplificación comprende:

10 un primer oligonucleótido de amplificación de hasta 100 nucleótidos de longitud, que comprende una primera secuencia la cual tiene una región de por lo menos 10 nucleótidos que tiene el 100% de identidad de las bases con por lo menos una región de 10 nucleótidos de la secuencia de SEQ ID NO: 7 ó SEQ ID NO: 43, siendo capaz dicho primer oligonucleótido de amplificación de hibridar con una secuencia de ácido nucleico diana que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 19 ó SEQ ID NO: 49 en condiciones que permiten que dicho primer oligonucleótido de amplificación actúe como un cebador para la síntesis del ácido nucleico; y

15 un segundo oligonucleótido de amplificación de hasta 100 bases de longitud, que comprende una primera secuencia que tiene una región de por lo menos 10 nucleótidos que tiene el 100% de identidad con las bases de una región de por lo menos 10 nucleótidos de la secuencia SEQ ID NO: 9 ó SEQ ID NO: 45, siendo capaz dicho segundo oligonucleótido de amplificación de hibridar con una secuencia de ácido nucleico diana que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 20 ó SEQ ID NO: 51 en condiciones que permiten que dicho segundo oligonucleótido de amplificación actúe como un cebador para la síntesis del ácido nucleico.

20 2. El juego de oligonucleótidos de amplificación de la reivindicación 1, en donde cada uno de dichos primer y segundo oligonucleótidos de amplificación tiene de 12 a 50 nucleótidos de longitud.

25 3. El juego de oligonucleótidos de amplificación de la reivindicación 1 ó 2, en donde:

la secuencia de dicho primer oligonucleótido de amplificación comprende la secuencia SEQ ID NO: 7 ó SEQ ID NO: 43;

30 la secuencia de dicho segundo oligonucleótido de amplificación comprende la secuencia SEQ ID NO: 9 ó SEQ ID NO: 45.

4. El juego de oligonucleótidos de amplificación de la reivindicación 1, en donde por lo menos uno de dichos primero y segundo oligonucleótidos de amplificación incluye una secuencia promotora reconocida por una ARN polimerasa o la cual potencia la iniciación o alargamiento mediante una ARN polimerasa.

35 5. El juego de oligonucleótidos de amplificación de la reivindicación 4, en donde dicha ARN polimerasa es la T7, T3 ó la SP6 ARN polimerasa.

40 6. El juego de oligonucleótidos de amplificación de la reivindicación 5, en donde dicha secuencia promotora consiste en la secuencia SEQ ID NO: 53.

7. El juego de oligonucleótidos de amplificación de la reivindicación 1, en donde:

45 la secuencia de dicho primer oligonucleótido de amplificación consiste en una secuencia que tiene por lo menos el 80% de bases idénticas a la secuencia SEQ ID NO: 7 ó SEQ ID NO: 43 y, opcionalmente, una secuencia promotora;

la secuencia de dicho segundo oligonucleótido de amplificación consiste en una secuencia que tiene por lo menos el 80% de bases idénticas a la secuencia SEQ ID NO: 9 ó SEQ ID NO: 45 y, opcionalmente, una secuencia promotora; y

50 dicha secuencia promotora es reconocida mediante una ARN polimerasa o potencia la iniciación o alargamiento mediante una ARN polimerasa.

8. El juego de oligonucleótidos de amplificación de la reivindicación 1, en donde:

55 la secuencia de dicho primer oligonucleótido de amplificación consiste en una secuencia que tiene por lo menos el 85% de bases idénticas a la secuencia SEQ ID NO: 7 ó SEQ ID NO: 43 y, opcionalmente, una secuencia promotora;

60 la secuencia de dicho segundo oligonucleótido de amplificación consiste en una secuencia que tiene por lo menos el 85% de bases idénticas a la secuencia SEQ ID NO: 9 ó SEQ ID NO: 45 y, opcionalmente, una secuencia promotora; y

65 dicha secuencia promotora es reconocida mediante una ARN polimerasa o potencia la iniciación o alargamiento mediante una ARN polimerasa.

ES 2 281 077 T3

9. El juego de oligonucleótidos de amplificación de la reivindicación 1, en donde:

la secuencia de dicho primer oligonucleótido de amplificación consiste en una secuencia que tiene por lo menos el 90% de bases idénticas a la secuencia SEQ ID NO: 7 ó SEQ ID NO: 43 y, opcionalmente, una secuencia promotora;

la secuencia de dicho segundo oligonucleótido de amplificación consiste en una secuencia que tiene por lo menos el 90% de bases idénticas a la secuencia SEQ ID NO: 9 ó SEQ ID NO: 45 y, opcionalmente, una secuencia promotora; y

dicha secuencia promotora es reconocida mediante una ARN polimerasa o potencia la iniciación o alargamiento mediante una ARN polimerasa.

10. El juego de oligonucleótidos de amplificación de la reivindicación 1, en donde:

la secuencia de dicho primer oligonucleótido de amplificación consiste en una secuencia que tiene por lo menos el 95% de bases idénticas a la secuencia SEQ ID NO: 7 ó SEQ ID NO: 43 y, opcionalmente, una secuencia promotora;

la secuencia de dicho segundo oligonucleótido de amplificación consiste en una secuencia que tiene por lo menos el 95% de bases idénticas a la secuencia SEQ ID NO: 9 ó SEQ ID NO: 45 y, opcionalmente, una secuencia promotora; y

dicha secuencia promotora es reconocida mediante una ARN polimerasa o potencia la iniciación o alargamiento mediante una ARN polimerasa.

11. El juego de oligonucleótidos de amplificación de la reivindicación 1, en donde:

la secuencia de dicho primer oligonucleótido de amplificación consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7 ó SEQ ID NO: 43 y, opcionalmente, una secuencia promotora;

la secuencia de dicho segundo oligonucleótido de amplificación consiste en la secuencia SEQ ID NO: 9 ó SEQ ID NO: 45 y, opcionalmente, una secuencia promotora; y

dicha secuencia promotora es reconocida mediante una ARN polimerasa o potencia la iniciación o alargamiento mediante una ARN polimerasa.

12. El juego de oligonucleótidos de amplificación de la reivindicación 11, en donde:

la secuencia de dicho primer oligonucleótido de amplificación consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7 ó SEQ ID NO: 43 y dicha secuencia promotora; y

la secuencia de dicho segundo oligonucleótido de amplificación consiste en la secuencia SEQ ID NO: 9 ó SEQ ID NO: 45.

13. El juego de oligonucleótidos de amplificación de la reivindicación 11, en donde:

la secuencia de dicho primer oligonucleótido de amplificación consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7 ó SEQ ID NO: 43; y

la secuencia de dicho segundo oligonucleótido de amplificación consiste en la secuencia SEQ ID NO: 9 ó SEQ ID NO: 45 y dicha secuencia promotora.

14. El juego de oligonucleótidos de amplificación de la reivindicación 11, en donde:

la secuencia de dicho primer oligonucleótido de amplificación consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7 ó SEQ ID NO: 43; y

la secuencia de dicho segundo oligonucleótido de amplificación consiste en la secuencia SEQ ID NO: 9 ó SEQ ID NO: 45.

15. El juego de oligonucleótidos de amplificación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde uno de dichos oligonucleótidos de amplificación tiene un terminal 3' el cual está modificado para prevenir o disminuir la cantidad de extensión del cebador de dicho oligonucleótido de amplificación.

16. El juego de oligonucleótidos de amplificación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, envasado en forma de un kit.

17. El kit de la reivindicación 16, que incluye además una sonda para ensayo de hibridación de hasta 100 nucleótidos de longitud que comprende un oligonucleótido que tiene por lo menos una región de 10 nucleótidos que tiene el

ES 2 281 077 T3

100% de bases idénticas con por lo menos una región de 10 nucleótidos en la secuencia SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, ó SEQ ID NO: 34, en donde dicha sonda hibrida con el ácido nucleico derivado de la *Neisseria gonorrhoeae* y no con el ácido nucleico derivado de la *Neisseria meningitidis* en condiciones restrictivas del ensayo de hibridación.

5

18. El kit de la reivindicación 17, en donde la secuencia de dicho oligonucleótido tiene por lo menos el 80% de bases idénticas con la secuencia SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 ó la SEQ ID NO: 34.

10

19. El kit de la reivindicación 17, en donde la secuencia de dicho oligonucleótido tiene por lo menos el 85% de bases idéntica con la secuencia SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 ó la SEQ ID NO: 34.

20. El kit de la reivindicación 17, en donde la secuencia de dicho oligonucleótido tiene por lo menos el 90% de bases idéntica con la secuencia SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 ó la SEQ ID NO: 34.

15

21. El kit de la reivindicación 17, en donde la secuencia de dicho oligonucleótido tiene por lo menos el 95% de bases idénticas con la secuencia SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 ó la SEQ ID NO: 34.

22. El kit de la reivindicación 17, en donde dicha sonda comprende la secuencia SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 ó la SEQ ID NO: 34.

20

23. El kit de la reivindicación 17, en donde la secuencia de dicha sonda tiene por lo menos el 80% de bases idénticas con la secuencia SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 ó la SEQ ID NO: 34.

25

24. El kit de la reivindicación 17, en donde la secuencia de dicha sonda tiene por lo menos el 85% de bases idénticas con la secuencia SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 ó la SEQ ID NO: 34.

25. El kit de la reivindicación 17, en donde la secuencia de dicha sonda tiene por lo menos el 90% de bases idénticas con la secuencia SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 ó la SEQ ID NO: 34.

30

26. El kit de la reivindicación 17, en donde la secuencia de dicha sonda tiene por lo menos el 95% de bases idénticas con la secuencia SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 ó la SEQ ID NO: 34.

27. El kit de la reivindicación 17, en donde la secuencia de dicha sonda consiste en la secuencia SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 ó la SEQ ID NO: 34.

35

28. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 27, en donde dicha sonda incluye una marca.

40

29. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28, que incluye además un oligonucleótido auxiliar hasta 100 nucleótidos de longitud y comprende por lo menos una región de 10 nucleótidos que tiene por lo menos el 80% de bases idénticas con por lo menos una región de 10 nucleótidos de la secuencia SEQ ID NO: 4 ó SEQ ID NO: 40.

30. El kit de la reivindicación 29, en donde dicho oligonucleótido auxiliar comprende la secuencia SEQ ID NO: 4 ó SEQ ID NO: 40.

45

31. El kit de la reivindicación 29, en donde la secuencia de dicho oligonucleótido auxiliar consiste en la secuencia SEQ ID NO: 4 ó SEQ ID NO: 40.

32. Una composición que comprende dicho juego de oligonucleótidos de amplificación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, y dicha sonda de ensayo de hibridación de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28.

50

33. La composición de la reivindicación 32, que comprende además dicho oligonucleótido auxiliar de una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31.

34. Un método para la amplificación de una secuencia diana presente en el ácido nucleico derivado de la *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra de ensayo, comprendiendo dicho método:

55

a) puesta en contacto de dicha muestra con dicho juego de oligonucleótidos de amplificación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15; y

60

b) exposición de dicha muestra en las condiciones que permitan que dicha secuencia diana sea amplificada en presencia de dicho juego de oligonucleótidos de amplificación.

35. Un método para la determinación de la presencia de una secuencia diana presente en el ácido nucleico derivado de la *Neisseria gonorrhoeae* en una muestra de ensayo, comprendiendo dicho método:

65

a) puesta en contacto de dicha muestra con dicho juego de oligonucleótidos de amplificación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15;

ES 2 281 077 T3

b) exposición de dicha muestra en las condiciones que permitan que dicha secuencia diana sea amplificada en presencia de dicho juego de oligonucleótidos de amplificación; y

5 c) determinación de si dicha secuencia diana, o un amplicón de la misma, está presente en dicha muestra como indicación de la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* en dicha muestra.

36. El método de la reivindicación 35, en donde dicho paso de determinación comprende el proporcionar a dicha muestra, dicha sonda de ensayo de hibridación de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28.

10 37. El método de la reivindicación 36, que incluye además dicho oligonucleótido auxiliar de una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 281 077 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: GEN-PROBE INCORPORATED
 - (B) CALLE: 9880 Campus Point Drive
 - 10 (C) CIUDAD: San Diego
 - (D) ESTADO: CA
 - (E) PAIS: USA
 - (F) CODIGO POSTAL (ZIP): 92121
- 15 (ii) TITULO DE LA INVENCION: SONDAS DE ACIDO NUCLEICO Y AMPLIFICACION DE OLIGO-NUCLEOTIDOS PARA ESPECIES DE *NEISSERIA*
- (iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 56
- 20 (iv) SOPORTE DE LECTURA EN EL ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
 - (B) ORDENADOR: PC IBM compatible
 - 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0,
Versión #1.30 (EPO)

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 1:

- 30 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 35 (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
 - (D) TOPOLOGIA: lineal
- (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:
- 40 GAACGTACCG GGTAGCGG 18

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 2:

- 45 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 38 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 50 (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
 - (D) TOPOLOGIA: lineal
- (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:
- 55 GGGATAACTG ATCGAAAGAT CAGCTAATAC CGCATACG 38

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 3:

- 60 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
 - 65 (D) TOPOLOGIA: lineal
- (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

ES 2 281 077 T3

GCCAATATCG GCGGCCGATG

20

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 4:

- 5 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 36 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
10 (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

15 ACGGTACCTG AAGAATAAGC ACCGGCTAAC TACGTG

36

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 5:

- 20 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 24 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
25 (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

30 GTCCCCTGCT TTCCCTCTCA AGAC

24

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 6:

- 35 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 28 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
40 (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

45 GGCGAGTGGC GAACGGGTGA GTAACATA

28

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 7:

- 50 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 36 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
55 (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

60 GCTGCTGCAC GTAGTTAGCC GGTGCTTATT CTTACG

36

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 8:

- 65 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 35 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
70 (D) TOPOLOGIA: lineal

ES 2 281 077 T3

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

GTTAGCCGGT GCTTATTCTT CAGGTACCGT CATCG

35

5 (2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

15 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

CGGGTTGTAA AGGACTTTTG TCAGGGAAGA AAAGGCCGTT

40

20 (2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

25 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

30

GAAGGCCTTC GGGTTGTAAA GGAC

24

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 11:

35 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

40 (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

45

GGCTGTTGCT AATATCAGCG

20

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 12:

50 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

55 (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

60

GGCTGTTGCT AATACCAGCG

20

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 13:

65 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 38 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

ES 2 281 077 T3

(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 13:

5 GCCTTCGGGT TGTAAGGAC TTTTGT CAGG GAAGAAAA 38

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 33 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
15 (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 14:

20 GCTGATGACG GTACCTGAAG AATAAGCACC GGC 33

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 20 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
30 (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 15:

CGCTGATATT AGCAACAGCC 20

35 (2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 20 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
45 (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 16:

CGCTGGTATT AGCAACAGCC 20

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 17:

50 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 38 pares de bases
55 (B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 17:

60 TTTTCTTCCC TGACAAAAGT CCTTTACAAC CCGAAGGC 38

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 18:

65 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 33 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 281 077 T3

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 18:

GCCGGTGCTT ATTCTTCAGG TACCGTCATC AGC

33

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 19:

CTGAAGAATA AGCACCGGCT AACTACGTGC AGCAGC

36

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 20:

AACGGCCTTT TCTTCCCTGA CAAAAGTCCT TTACAACCCG

40

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 35 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 21:

CGATGACGGT ACCTGAAGAA TAAGCACCGG CTAAC

35

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 22:

GTCCTTTACA ACCCGAAGGC CTTC

24

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

ES 2 281 077 T3

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

5 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 23:

GTCTTGAGAG GGAAAGCAGG GGAC

24

10 (2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 28 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

15

20 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 24:

TATGTTACTC ACCCGTTCGC CACTCGCC

28

25 (2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

25

30

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 25:

35

GGCUGUUGCU AAUAUCAGCG

20

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 26:

40 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

40

45

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 26:

50

GGCUGUUGCU AAUACCAGCG

20

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 27:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

55

60

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 27:

65

CGCUGAUUUU AGCAACAGCC

20

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 281 077 T3

5	(A) LONGITUD: 20 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria (D) TOPOLOGIA: lineal	
	(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 28:	
10	CGCUGGUAUU AGCAACAGCC	20
	(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 29:	
15	(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 18 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria (D) TOPOLOGIA: lineal	
20	(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 29:	
25	CCGCTACCCG GTACGTTC	18
	(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 30:	
30	(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 20 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria (D) TOPOLOGIA: lineal	
35	(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 30:	
40	CATCGGCCGC CGATATTGGC	20
	(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 31:	
45	(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 18 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria (D) TOPOLOGIA: lineal	
50	(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 31:	
55	GAACGUACCG GGUAGCGG	18
	(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 32:	
60	(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 20 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria (D) TOPOLOGIA: lineal	
65	(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 32:	
	GCCAAUAUCG GCGGCCGAUG	20

ES 2 281 077 T3

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 33:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 33:

CCGCUACCCG GUACGUUC

18

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 34:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 34:

CAUCGGCCGC CGAUAUUGGC

20

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 38 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 35:

GCCUUCGGGU UGUAAAGGAC UUUUGUCAGG GAAGAAAA

38

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 36:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 33 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 36:

GCUGAUGACG GUACCUGAAG AAUAAGCACC GGC

33

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 37:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 38 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 37:

ES 2 281 077 T3

UUUUCUCCCC UGACAAAAGU CCUUUACAAC CCGAAGGC

38

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 38:

5 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

10 (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 38:

15 GCCGGUGCUU AUUCUUCAGG UACCGUCAUC AGC

33

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 39:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

20 (A) LONGITUD: 38 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

25 (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 39:

30 GGGUAACUG AUCGAAAGAU CAGCUAAUAC CGCAUACG

38

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 40:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

35 (A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

40 (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 40:

45 ACGGUACCUG AAGAAUAAGC ACCGGCUAAC UACGUC

36

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 41:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

50 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

55 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 41:

GUCCCCUGCU UUCCCUCUCA AGAC

24

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 42:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

65 (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

ES 2 281 077 T3

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 42:

GGCGAGUGGC GAACGGGUGA GUAACAUA

28

5 (2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 43:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

15 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 43:

GCUGCUGCAC GUAGUUAGCC GGUGCUUAUU CUUCAG

36

20 (2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 44:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 35 pares de bases

25 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

30 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 44:

GUUAGCCGGU GCUUAUUCUU CAGGUACCGU CAUCG

35

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 45:

35 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

40 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 45:

45 CGGGUUGUAA AGGACUUUUG UCAGGGAAGA AAAGGCCGGU

40

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 46:

50 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

55 (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 46:

60 GAAGCCUUC GGGUUGUAAA GGAC

24

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 47:

65 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

ES 2 281 077 T3

(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 47:

5 GUCUUGAGAG GGAAAGCAGG GGAC 24

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 48:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 28 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
15 (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 48:

20 UAUGUUACUC ACCCGUUCGC CACUCGCC 28

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 49:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 36 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
30 (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 49:

35 CUGAAGAAUA AGCACCGGCU AACUACGUGC AGCAGC 36

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 50:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 35 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
45 (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 50:

50 CGAUGACGGU ACCUGAAGAA UAAGCACCGG CUAAC 35

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 51:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 40 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
60 (D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 51:

65 AACGGCCUUU UCUUCCUGA CAAAAGUCCU UUACAACCCG 40

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 52:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 281 077 T3

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 52:

5

GUCCUUUUACA ACCCGAAGGC CUUC

24

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 53:

10

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 53:

20

AATTTAATAC GACTCACTAT AGGGAGA

27

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 54:

25

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 54:

35

GAGUAAAGUU AAUACCUUUG

20

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 55:

40

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

45

(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 55:

50

GGCUGUUGCU AAUAUCAGCG

20

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 56:

55

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

60

(D) TOPOLOGIA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 56:

65

GGCUGUUGCC AAUAUCGGGG

20