

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 857 513**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6883** (2008.01)

**C12Q 1/6893** (2008.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2016 PCT/EP2016/066561**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2017 WO17009347**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2016 E 16739091 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2020 EP 3322817**

54 Título: **Oligonucleótidos y su uso**

30 Prioridad:

**13.07.2015 DE 102015111267**  
**07.08.2015 DE 102015113038**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.09.2021**

73 Titular/es:

**KANN, SIMONE (100.0%)**  
**Ravensburgstrasse 14**  
**97209 Veitshöchheim, DE**

72 Inventor/es:

**HANSEN, JESSICA;**  
**SIEVERTSEN, JUERGEN y**  
**KANN, SIMONE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 857 513 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**

Oligonucleótidos y su uso

5 La presente invención se refiere a oligonucleótidos y se refiere al uso de los oligonucleótidos para el diagnóstico médico. En particular, la invención se refiere a oligonucleótidos que pueden encontrar uso para una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas pertenece a las infecciones parasitarias y es provocada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). El germen es transmitido principalmente por diferentes reduvidos chupadores de sangre. También están documentadas transmisiones congénitas, transmisión mediante transfusiones de sangre y trasplantes de órganos, transmisiones por alimentos contaminados y transmisiones por accidentes de laboratorio.

10 Más de 150 animales domésticos y salvajes sirven como reservorio, pero también seres humanos infectados de forma asintomática colaboran en su difusión. 100 millones de personas viven con el riesgo de ser infectados, alrededor de 18 millones ya están infectados. Con ello, Chagas se encuentra en el 6º puesto de las “Enfermedades de Carga Mundial” y representa un gran problema para Sudamérica y Centroamérica. Mediante la migración incrementada de personas infectadas a los EE.UU. y a España y Portugal aumentan también allí los casos de la enfermedad de Chagas.

Diferentes especies de reduvidos (familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatomae*) sirven como vectores. Ingieren a los gérmenes patógenos al chupar la sangre. Los gérmenes patógenos se multiplican en el insecto y luego, cuando el reduvido chupa sangre de un nuevo huésped, por ejemplo de un ser humano, son secretados con las heces del reduvido durante el acto de chupar.

20 La picadura del reduvido es la mayoría de las veces indolora, pero deja una lesión en la piel y un prurito. Si la persona picada combate el prurito (a menudo instintivamente) mediante restriegos, los gérmenes patógenos son incorporados mediante restriegos con las heces del reduvido en la herida.

25 También es posible una infección a través de las mucosas de los ojos (conjuntiva), de la nariz o de la boca. En el tejido, los gérmenes patógenos penetran en la célula huésped y se multiplican mediante bipartición, formando los denominados pseudoquistes. Finalmente, los pseudoquistes revientan y liberan a los parásitos que luego son transportados a través del torrente sanguíneo a nuevas células huésped y, de esta forma, inician otros ciclos de multiplicación. Durante la siguiente ingesta de sangre se infectan otros reduvidos, para lo cual son suficientes incluso bajas parasitemias. Los reduvidos son animales nocturnos. Pueden alcanzar hasta 2 años de edad y se multiplican mediante puesta de huevos. Su radio asciende a varios cientos de metros. Todos los estadios (adultos y larvas) y ambos sexos chupan sangre. Una vez infectados, permanecen siendo infecciosos durante toda su vida.

35 En el caso del hombre, la enfermedad de Chagas discurre en diferentes estadios. En la fase aguda puede producirse una reacción inflamatoria local (chagoma) con hinchazón vecina de los ganglios linfáticos. Si ésta se produce en el ojo, se produce el característico signo de Romaña, una conjuntivitis con edema del párpado e inflamación pre-auricular de los ganglios linfáticos. No obstante, el signo de Romaña aparece solo raras veces (< 5%). Los síntomas inespecíficos de la enfermedad se asemejan a una infección gripal. Los síntomas desaparecen de nuevo, por lo general, de forma espontánea, a menudo en el espacio de 2 a 4 semanas. En unos pocos casos, en este estadio se produce una meningoencefalitis o miocarditis con un resultado letal.

40 Después sigue una fase de latencia. También aquí tiene lugar un test serológico positivo y, de vez en cuando, también una ligera parasitemia; a esta fase se la denomina también forma indeterminante o forma crónicamente indeterminante. Normalmente, esta fase discurre sin molestias, pero exámenes han demostrado aquí ya en algunos casos trastornos discretos del sistema nervioso.

El 30 a 40% de los afectados pasan entonces a un estadio crónico, el cual va acompañado de alteraciones graves en el corazón (cardiomiopatía, muerte cardíaca repentina, etc.) o en el tracto gastrointestinal (megacolon, megaloesófago, etc.).

45 Ciertamente, la enfermedad de Chagas podría ser diagnosticada en la fase aguda, dado que la densidad de parásitos es elevada (frotis, procedimiento de concentración, procedimiento de la capa leucocitaria, etc.), pero esto no sucede, sin embargo, la mayoría de las veces, ya sea porque no se consulta al médico o no se consideran los síntomas relacionados con Chagas. Por lo tanto, la mayoría de las veces se diagnostica posteriormente de forma serológica.

50 Como agentes terapéuticos se dispone actualmente de dos principios activos: Benznidazol (medicamentos: Ragonil®, Radanil®) y Nifurtimox (medicamento: Lampit®). Debido al perfil de efectos secundarios algo más favorable, Benznidazol es la primera elección. Sin embargo, ambos principios activos son tóxicos y deberían ser administrados al comienzo de forma estacionaria. Destruyen a los parásitos en la sangre y, por lo tanto, son particularmente exitosos en la fase aguda. Los tratamientos son de larga duración (60-90 días para Benznidazol, 90-120 días para

Nifurtimox). Las ventajas y desventajas deben ser bien sopesadas por el médico tratante. Durante el embarazo no deben emplearse.

5 Con el fin de interrumpir el círculo de las infecciones, junto a medidas de control y prevención (mejora de las condiciones de vida, fumigaciones, exploración, etc.) deben estar disponibles también buenos kits y métodos de diagnóstico, con el fin de reconocer de manera prematura a Chagas, tratarla e impedir la propagación mediante reservorios (ser humano y animal). Los donantes de sangre y órganos deberían ser rastreados en cuanto a la enfermedad de Chagas, descubrir y tratar infecciones congénitas y reactivaciones en el caso de la inmunosupresión. Para ello, se requieren nuevos kits y métodos de diagnóstico que presenten una mejor sensibilidad y especificidad que los medios y procedimientos ya conocidos.

10 Además, en todos los enfoques diagnósticos es importante diferenciar *T. cruzi* de otros tripanosomas emparentados y, en parte, apatógenos (tales como, p. ej., *T. rangeli*): en virtud de la toxicidad, un tratamiento que sigue a un diagnóstico "positivo" con los principios activos arriba mencionados no es justificable en virtud de la toxicidad cuando el diagnóstico positivo se remonte erróneamente al reconocimiento de un germen apatógeno.

15 Hasta la fecha falta una regla de oro para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. En el estadio crónico se aplican la mayoría de las veces procedimientos serológicos. Debido a las pequeñas cantidades de gérmenes patógenos, tal como son frecuentes en el caso de una forma crónica o crónicamente indeterminada de la enfermedad de Chagas, en el estado de la técnica se describió ya la PCR para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas junto a otros métodos de diagnóstico.

20 En un gran estudio multicentros (A G Schijman et al (2011), International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* ADN in Blood Samples from Chagas Disease Patients, PLoS Negl Trop Dis 5 (1): e931) se testaron de manera confrontada 48 PCRs. En este caso, los autores llegaron a la conclusión de que 4 PCRs fueron declaradas las mejores. Una de ellas era la Gel-PCR(LbQ IDNA) convencional. Las otras tres eran las Sat-DNA-PCR's LbD2-Sat-DNA-PCR, LbD3-Sat-DNA-PCR y LbF1-Sat-DNA-PCR. La mencionada en último lugar (LbF1-Sat-DNA-PCR) se denomina en lo que sigue "TCZ-PCR".

25 El enfoque reseñado por Schijmann et al. fue recogido por "Y Qvarnström et al., (2012), Sensitive and Specific Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Clinical Specimens using a multi-Target Real-Time PCR Approach, PLoS Negl Trop Dis 6(7): e1689): compararon un colectivo de Chagas positivo ya conocido con los resultados de los minisatélites TCZ-PCR, de la PCR de cinetoplastos guía (kADN-PCR) y una PCR de 18s-ARNr, la cual se considera como particularmente específica. A partir de los datos pueden calcularse las siguientes sensibilidades o bien especificidades:

30 78 % o bien 40 % para kADN-PCR;  
63 % o bien 100 % para TCZ-PCR;  
6 % o bien 100 % para 18s-ARNr-PCR

35 Los autores llegaron a la conclusión de que solo en aquellos pacientes para los que en todas las tres PCRs se producían resultados del ensayo positivos, podría establecerse un diagnóstico seguro de Chagas. Cada una de las muestras que solo proporcionó un resultado positivo en kADN-PCR y/o TCZ-PCR, se requería una exploración adicional. Sin embargo, ésta sigue siendo teoría in situ: por motivos de coste y/o como consecuencia de la ausencia de un equipo adecuado ya no se llevan a cabo etapas de diagnóstico adicionales. Con ello, en la práctica queda poco claro el diagnóstico y, por lo tanto, no se lleva a cabo una terapia.

40 No obstante, a partir de las investigaciones que fueron reseñadas en los documentos antes mencionados resulta que a la PCR de tiempo real (RT-PCR) se le asigna una elevada importancia.

En el documento CA 2736087 A1 se describe una sonda para la detección de *Trypanosoma cruzi* en muestras biológicas.

45 Además, siguen siendo insuficientes los procedimientos aplicados para establecer infecciones agudas o enfermedades congénitas, para el control con éxito después de una terapia, en el caso de la reactivación bajo inmunosupresión o para la detección del reservorio de gérmenes patógenos y controles de medidas, así como para el rastreo antes de trasplantes de órganos.

50 En el marco de la invención se examinó un colectivo de muestras que se diferencia por un número elevado de voluntarios (1009 frente a 119 - Qvarnström, loc. cit.), la presencia de todos los grupos de edades, la presencia de personas sanas, así como diferentes estadios de la enfermedad de Chagas (aguda, crónica, crónica-indeterminante, negativa) del colectivo de Qvarnström.

En el marco de experimentos propios se detectó, en particular, que la kADN-PCR conduce a numerosos resultados falsos positivos. Estos se basan predominantemente en reacciones cruzadas con *Trypanosoma rangeli*. En



una muestra de tejido o en una muestra de sangre o en una muestra de plasma o en una muestra de suero de un ser humano.

Además, aquí se dan a conocer los siguientes oligonucleótidos: (i) oligonucleótidos de la secuencia SEQ ID NO 1 u oligonucleótidos con secuencias de nucleótidos homólogas a la anterior, o (ii) oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 1 u oligonucleótidos con secuencias de nucleótidos homólogas a la secuencia de nucleótidos complementaria; o (iii) oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 1 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

10                   ccccwccwcc vnd           13           SEQ ID NO 1,  
                  en donde           w representa a o t;  
                                  v representa a o c o g,  
                                  d representa a o g o t; y  
                                  n representa c o g o t.

La invención se refiere también a oligonucleótidos de SEQ ID NO 2

15                   ccccacctcc ccg           13           SEQ ID NO 2

y oligonucleótidos relacionados con los mismos, tal como se reivindica en la reivindicación 11 y se describe a modo de ejemplo en lo que sigue.

En el marco de la invención se creó, por lo tanto, una secuencia de nucleótidos específica para la región diferenciadora en el ADN de *Trypanosoma cruzi* de una sonda que es adecuada para un uso en la PCR en tiempo real, así como cebadores directos y cebadores inversos combinables con la misma.

20 Particularidades del enfoque llevado a cabo resultan de los datos experimentales y se explican allí.

En el marco de la presente invención se reivindican y se describen en el marco de formas de realización preferidas en la memoria descriptiva, oligonucleótidos que se caracterizan por las SEQ ID NOs 1 a 16 indicadas en particular de acuerdo con la lista de secuencias perteneciente a la memoria descriptiva.

25 Por "oligonucleótidos" se entienden en el marco de las reivindicaciones y de la presente memoria descriptiva secuencias lineales a base de hasta 40 nucleótidos unidos entre sí de forma covalente a través de puentes diéster de ácido fosfórico desde el átomo de C 3' de un nucleótido al átomo de C 5' del siguiente nucleótido. Habitualmente, estos se abrevian (también así en las presentes reivindicaciones y en la memoria descriptiva) con las letras en minúscula a (para adenina), c (para citosina), g para guanina y t para timina. Secuencias lineales son representadas por la yuxtaposición covalente de los distintos nucleótidos. En este caso, la secuencia de nucleótidos indicada se lee  
30 siempre en la dirección 5' → 3'.

En el marco de la presente invención, los oligonucleótidos de acuerdo con la invención se entienden siempre

- (i) como oligonucleótidos con la secuencia SEQ ID NO indicada, o
- ii) como oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO indicada; o
- 35 iii) como oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO indicada con respecto a la dirección de lectura 5' → 3'.

40 Para los casos de secuencias de nucleótidos que son homólogas a una secuencia de nucleótidos indicada se utilizan - asimismo como es habitual - letras concretas para distintos nucleótidos homólogos que resultan en concreto particularmente de las reivindicaciones y de la siguiente memoria descriptiva. Inserciones que se manifiestan en casos individuales se caracterizan con símbolos definidos de manera particular (\*, \*\*, §, #).

La invención se describe en lo que sigue haciendo referencia a formas de realización preferidas de secuencias de nucleótidos reproducidas asimismo en la lista de secuencias. Sin embargo, la invención no se limita a las formas de realización preferidas descritas. Éstas posibilitan, en primer término, una mejor comprensión de la invención y deben servir para la ilustración a modo de ejemplo de la invención.

45 Oligonucleótidos de acuerdo con la invención tienen, en una forma de realización de la invención, la secuencia de nucleótidos indicada bajo SEQ ID NO 3:

                  cgaacccc\*w ccwyc           15           SEQ ID NO 3,  
                  en donde           w representa a o t,  
                                  y representa c o t; y

\* representa una inserción "c".

5 Esta forma de realización de la invención comprende oligonucleótidos con la secuencia SEQ ID NO 3 indicada u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 3 indicada u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 3 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3'.

10 En una forma de realización preferida, dado que proporciona resultados ventajosos en relación con el uso, la cual no limita sin embargo la invención, la invención se refiere a oligonucleótidos que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 14 (similar a la secuencia con la SEQ ID NO 3) u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 14 indicada u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 14 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

cgaacccwc cwyc 14 SEQ ID NO 14,

en donde w representa a o t; e  
y representa c o t.

15 En otra forma de realización preferida, dado que proporciona resultados ventajosos en relación con el uso, la cual no limita sin embargo la invención, la invención se refiere a oligonucleótidos que comprenden o incluso se componen de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 4 (similar a la secuencia con la SEQ ID NO 3 y la secuencia con la SEQ ID NO 14) u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 4 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 4 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3'.

20 cgaacccc\*a cctcc 15 SEQ ID NO 4,

en donde \* representa una inserción "c".

25 Todavía más preferida es una forma de realización de la invención con oligonucleótidos que comprenden o incluso se componen de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 10 (similar a la secuencias con la SEQ ID NO 3 y la SEQ ID NO 14 y la SEQ ID NO 4) u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 10 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 10 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

cgaacccac ctcc 14 SEQ ID NO 10

30 En formas de realización alternativas, la invención se refiere a oligonucleótidos, los cuales - como se puede observar en lo que sigue - contienen secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NOs 3 o 4 o 10 o 14 precedentes, pero que en su extremo 5' y/o extremo 3' presentan unidas otras secuencias de nucleótidos, o se refieren a oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos indicada u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos indicada con respecto a la dirección de lectura 5' → 3'.

35 Estos oligonucleótidos comprenden las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO 5:

caacccaat cgaacccc\*w cwyc vnd\*\*d §nm#hwhy 38 SEQ ID NO 5,

en donde w representa a o t;  
m representa a o c;  
y representa c o t;  
40 v representa a o c o g;  
d representa a o g o t;  
h representa a o c o t;  
n representa a o c o g o t;  
\* representa la inserción c;  
45 \*\* representa la inserción t,  
§ representa la inserción g, y  
# representa la inserción c.

50 Oligonucleótidos preferidos del grupo antes mencionado comprenden oligonucleótidos de la SEQ ID NO 15 u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 15 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 15 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

caacccaat cgaacccc\*a cctcccg\*\*a §aa#attc 38 SEQ ID NO 15,

en donde \* representa la inserción c;  
 \*\* representa la inserción t,  
 § representa la inserción g, y  
 # representa la inserción c.

5 Asimismo oligonucleótidos preferidos del grupo antes mencionado comprenden oligonucleótidos de la SEQ ID NO 11 o comprenden oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 11 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 11 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

caacccaat cgaacccwc cwycvnddm hwby 34 SEQ ID NO 11

10 en donde w representa a o t;  
 m representa a o c;  
 y representa c o t;  
 v representa a o c o g;  
 d representa a o g o t;  
 15 h representa a o c o t; y  
 n representa a o c o g o t.

Asimismo oligonucleótidos preferidos del grupo antes mencionado comprenden oligonucleótidos de la SEQ ID NO 16 u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 16 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 16 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

caacccaat cgaacccac ctccccgaaa attc 34 SEQ ID NO 16.

El grupo de oligonucleótidos de la SEQ ID NO 16 mencionado en último lugar es particularmente preferido en virtud del reconocimiento preestablecido de secuencias de gérmenes de *Trypanosoma cruzi*.

25 En formas de realización de la invención preferidas adicionales, que pueden ponerse en práctica por sí solas o con otras características de la invención y que no han de limitar la invención, la invención se refiere a oligonucleótidos de la SEQ ID NO 3 o SEQ ID NO 4 o SEQ ID NO 5 o SEQ ID NO 10 o SEQ ID NO 11 o SEQ ID NO 14 o SEQ ID NO 15 o SEQ ID NO 16 definidas precedentemente que presentan una o varias marcas en uno o en los dos de sus extremos 5' y/o extremos 3'. Marcas de este tipo, las cuales pueden servir para fines determinados en el caso del posterior uso de los oligonucleótidos, son generalmente conocidas por el experto en la materia y, por lo tanto, pueden elegirse de manera correspondiente a las particularidades de marcas conocidas del estado de la técnica. En formas de realización preferidas adicionales, la una o las varias marcas son marcadores y, todavía más preferiblemente, son marcadores o extintores de la fluorescencia. A modo de ejemplo, en este punto se pueden utilizar marcadores o bien extintores de la fluorescencia conocidos, tales como FAM o BHQ1.

35 Oligonucleótidos de las SEQ ID NOs 3, 4, 5, 10, 11, 14, 15 y/o 16 de acuerdo con la descripción precedente pueden utilizarse, por ejemplo (sin limitación) como sondas para la PCR y sirven, de acuerdo con la invención, de manera particularmente preferida como sondas para la PCR en tiempo real, sin limitar a este uso el uso de los oligonucleótidos de acuerdo con la invención.

40 En formas de realización de la invención preferidas adicionales, las cuales se pueden poner en práctica por sí solas o con otras características de la invención y que no han de limitar la invención, los oligonucleótidos de la SEQ ID NO 3 o SEQ ID NO 4 o SEQ ID NO 5 o SEQ ID NO 10 o SEQ ID NO 11 o SEQ ID NO 14 o SEQ ID NO 15 o SEQ ID NO 16 precedentemente descritos se encuentran, de acuerdo con la descripción a modo de ejemplo arriba detallada, en combinación con uno o varios de otros oligonucleótidos del grupo cebador directo y cebador inverso.

45 Más preferiblemente, por ejemplo oligonucleótidos de la SEQ ID NO 3 o SEQ ID NO 4 o SEQ ID NO 5 o SEQ ID NO 10 o SEQ ID NO 11 o SEQ ID NO 14 o SEQ ID NO 15 o SEQ ID NO 16 pueden combinarse con un cebador (1), por ejemplo en forma de oligonucleótidos de la secuencia de oligonucleótidos de la SEQ ID NO 6, o de oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 6 o de oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 6 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

gcactatatt acaccaacc c 21 SEQ ID NO 6

50 y/o con un cebador (2), por ejemplo en forma de una secuencia de oligonucleótidos de la SEQ ID NO 7, o de oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 7 o de oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 7 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

catgcawctc mcccgtm 17 SEQ ID NO 7;

en donde w representa a o t; y  
m representa a o c.

5 En una forma de realización preferida, dado que representa una buena base de reconocimiento, de combinaciones con oligonucleótidos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 7, que se puede realizar por si sola o con otras características de la invención y que no ha de limitar la invención o de oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 7 o de oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 7 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3', la secuencia de nucleótidos es una de la SEQ ID NO 12:

10 catgcattc ccccgta 17 SEQ ID NO 12.

Preferiblemente, el cebador (1) es un cebador directo y/o el cebador (2) es un cebador inverso. En otra forma de realización de la invención, el cebador (2) es un cebador directo y/o el cebador (1) es un cebador inverso.

15 Como cebador (1) y/o cebador (2) pueden utilizarse también oligonucleótidos que contienen en su extremo 5' y/o en su extremo 3' unidas otras secuencias de nucleótidos, pero en cualquier caso una secuencia de oligonucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NOs 6 y/o 7 precedentes (o al menos un homólogo de las mismas):

20 Con ello, la invención se refiere también a combinaciones a base de oligonucleótidos de las SEQ ID NOs 4, 5, 6, 7, 10, 11 y 12 precedentemente definidas que comprenden: como cebador (1) secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO 8 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 8 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 8 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

taaccaactg gcactatatt acaccaaccc caat 34 SEQ ID NO 8

25 y/o que comprenden como cebador (2) secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO 9 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 9 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 9 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

vbsbnrdwwk catgcawctc mcccgtmcat taty\*bn 38 SEQ ID NO 9

30 en donde s representa c o g;  
w representa a o t;  
r representa a o g;  
y representa c o t;  
k representa g o t;  
v representa a o c o g;  
d representa a o g o t;  
35 b representa c o g o t,  
n representa a o c o g o t, y  
\* representa la inserción "s".

40 En una forma de realización preferida, dado que representa una buena base de reconocimiento, de combinaciones con oligonucleótidos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 9, que se puede realizar por si sola o con otras características de la invención y que no ha de limitar la invención o de oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 9 o de oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 9 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3', la secuencia de nucleótidos es una de la SEQ ID NO 13:

ggcagaatt catgcattc cccgtacat tatt\*ta 38 SEQ ID NO 13,

en donde \* representa la inserción „s“.

45 Más preferiblemente, también en este caso el cebador (1) es un cebador directo y/o el cebador (2) es un cebador inverso, o el cebador (2) es un cebador directo y/o el cebador (1) es un cebador inverso.

50 Además, la invención, de acuerdo con otro aspecto, se refiere a oligonucleótidos de la secuencias SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 y SEQ ID NO 16, tal como se describen en detalle precedentemente, son para uso en la amplificación de secuencias de nucleótidos de gérmenes patógenos. En particular se han acreditado los oligonucleótidos de acuerdo con las SEQ ID NOs 3 a 16 precedentemente indicadas,

en la amplificación exclusiva de secuencias de ADN de *Trypanosoma cruzi*, en una mezcla de ADN de distinta procedencia, de manera particularmente preferida mediante PRC, de acuerdo con la invención lo más preferiblemente mediante PCR en tiempo real.

5 Los resultados de la realización de una PCR en tiempo real con las combinaciones de acuerdo con la invención a base de cebadores (cebadores directos y cebadores inversos) con una sonda de oligonucleótidos de acuerdo con la invención (eventualmente con marcadores) de acuerdo con la descripción precedente apuntan - sin desear comprometerse a estas interpretaciones - , a que la región identificada del ADN de *Trypanosoma cruzi* es una característica diferencial significativa con respecto al ADN de *Trypanosoma rangeli*. No se observan reacciones cruzadas con respecto a *Trypanosoma rangeli*.

10 Cepas de *Trypanosoma cruzi* sometidas a ensayo en el marco de la invención son las cepas *Trypanosoma cruzi* CL Brenner (Hg 39), *Trypanosoma cruzi* tipo Y (Vero) y *Trypanosoma cruzi* Brasil (HG 39). Estas fueron detectadas en las nuevas PCR's en tiempo real utilizando los oligonucleótidos de acuerdo con la invención. Por otra parte, no se dan reacciones cruzadas con *Malaria tertiana* y *Malaria tropica* y *Leishmania brasiliensis*.

15 Por lo tanto, la invención se refiere también al uso de los oligonucleótidos de las SEQ ID NOs 3 a 11 y 13 a 16 definidas para la determinación de la presencia o ausencia de ADN de *Trypanosoma cruzi* en el cuerpo de un animal o ser humano, preferiblemente en el cuerpo de un insecto, un ave de corral, un mamífero o un ser humano, más preferiblemente en una muestra de un tejido corporal o de un fluido corporal de un ave de corral, un mamífero o un ser humano, lo más preferiblemente en una muestra de tejido o una muestra de sangre o una muestra de plasma o una muestra de suero de un ser humano.

20 La invención se refiere, además, al uso de los oligonucleótidos de las SEQ ID NOs 3 a 11 y 13 a 16 definidas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en el cuerpo de un animal o ser humano, preferiblemente en el cuerpo de un insecto, un ave de corral, un mamífero o un ser humano, más preferiblemente en una muestra de un tejido corporal o de un fluido corporal de un ave de corral, un mamífero o un ser humano, lo más preferiblemente en una muestra de tejido o una muestra de sangre o una muestra de plasma o una muestra de suero de un ser humano.

25 Como se ha descrito arriba, también se dan a conocer aquí los siguientes oligonucleótidos:

- (i) oligonucleótidos con la secuencia SEQ ID NO 1 u oligonucleótidos con secuencias de nucleótidos homólogas a la misma, o
- ii) oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 1 u oligonucleótidos con secuencias de nucleótidos homólogas a la secuencia de nucleótidos complementaria; o
- 30 iii) oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 1 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3' u oligonucleótidos con secuencias de nucleótidos homólogas a la secuencia de nucleótidos opuesta:

ccccwccvcc vnd      13      SEQ ID NO 1,

35 en donde      w representa a o t;  
v representa a o c o g;  
d representa a o g o t; y  
n representa a o c o g o t,

40 los cuales se adecuan para la diferenciación de la secuencia de gérmenes de *Trypanosoma cruzi* de secuencias de otros *Trypanosoma*, por ejemplo *Trypanosoma rangeli*.

En una forma de realización preferida, dado que representa una buena base de reconocimiento, la invención se refiere a oligonucleótidos que comprenden o que se componen de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 2, u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 2 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 2 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

ccccacctcc ccg      13      SEQ ID NO 2,

con la cual se consigue una diferenciación particularmente fiable de la secuencia de gérmenes de *Trypanosoma cruzi* de *Trypanosoma rangeli*, a diferencia de las PCR's del estado de la técnica descritas al comienzo.

## ES 2 857 513 T3

### Parte experimental: Parte 1:

En el progreso de la PCR reproducido en la siguiente combinación de Tablas se sometieron a ensayo diferentes muestras de ADN de diferentes voluntarios. Todas las muestras fueron examinadas mediante serología (test rápido [Chagas Ab Rapid de Standard Diagnostics] o ELISA [Elisa doméstico del Laboratorio de Salud], inmunofluorescencia [inmunofluorescencia doméstica, Bernhard-Nocht Institut für Tropenmedizin]), kADN-PCR, TCZ-PCR, 18s-ARNr-PCR.

- 5 Las muestras designadas en la Tabla con “Cruzi”, “Rangeli” y “Homo s” se secuenciaron adicionalmente.
- “Muestra Neg.” 1 – 4 son muestras de voluntarios que eran negativas en todos los exámenes serológicos y métodos de PCR.

“Tulahuen” designa dos controles positivos con dos concentraciones diferentes.

- 10 Para la PCR se utilizaron los siguientes cebadores preferidos:

Cebador 1 (Directo): (SEQ ID NO 6)    gcactatatt acaccaacc c    (21 Nucleótidos)

Cebador 2 (Inverso): (SEQ ID NO 12)    catgcatctc ccccgta    (17 Nucleótidos)

Sonda: (SEQ ID NO 10)    cgaacccac ctcc    (14 Nucleótidos)

Para la PCR se utilizó la siguiente tanda de reacción desarrollada como óptima:

- 15 10 µl de 2 x Master Mix (HotStar Taq Mastermix, razón social Qiagen)  
 1 µl de cebador directo 8 pmol (SEQ ID NO 6)  
 1 µl de cebador inverso 8 pmol (SEQ ID NO 12)  
 1 µl de sonda 2 pmol (SEQ ID NO 10)  
 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mmol  
 3 µl de agua dest.

Los 18 µl de Mix descritos se combinaron en cada caso con 2 µl del ADN extraído de la muestra a examinar.

Como control positivo se utilizó ADN de *Trypanosoma tulahuen* en la misma concentración.

- 20 El programa Cycler del aparato (Rotorgene, razón social Qiagen) se programó de la siguiente manera:

15 min a 95 °C; a continuación  
 45 ciclos durante 15 s a 95 °C y durante 60 s a 60 °C; a continuación  
 30 s a 40 °C.

Los resultados se pueden tomar de las siguientes Tablas

- 25 Tabla 1

#### Información del Experimento

Nombre Operación	Muestras definidas en progreso
Inicio Operación	5/5/2015 3:31:52 AM
Finalización Operación	5/5/2015 5:38:03 AM
Operador	PCR
Notas	
Software de Desarrollo Versión	Rotor-Gene 2.1.0.9
Firma de la Operación	Firma de la Operación es válida.
Aumento de Verde	8.
Aumento de Amarillo	10.
Aumento de Naranja	10.
Aumento de Rojo	10.

#### Tabla 2

#### Información de Cuantificación













Umbral	0,00483
Umbral Izquierdo	1,000
Curva Patrón Importada	No
Curva Patrón (1)	N/D

ES 2 857 513 T3
















Curva Patrón (2)	N/D
Inicio normalizante del ciclo	1
Corrección Pendiente de Ruido	Sí
Sin Umbral de Control del Molde	% 3
Umbral de Eficiencia de Reacción	Inhabilitado
Método de Normalización	Normalización del Tubo Dinámico
Filtro Digital	Luz
Página de Muestra	Página 1
Ajustes de Análisis Importados	

Resultados:
















Tabla 3

Nº	Color	Nombre	Tipo	Ct	Comentario Ct	Conc Dada (Copias)	Conc Calc (Copias)
1		Cruzi 1	Desconocido	33,93			
2		Cruzi 1	Desconocido	28,89			
3		Cruzi 1	Desconocido	39,95			
4		Cruzi 2	Desconocido	32,92			
5		Cruzi 2	Desconocido	33,70			
6		Cruzi 2	Desconocido	35,03			
7		Cruzi 3	Desconocido	29,76			
8		Cruzi 3	Desconocido	30,03			
9		Cruzi 3	Desconocido	29,83			
10		Cruzi 4	Desconocido	35,73			
11		Cruzi 4	Desconocido	33,02			
12		Cruzi 4	Desconocido	36,50			














ES 2 857 513 T3

Nº	Color	Nombre	Tipo	Ct	Comentario Ct	Conc Dada (Copias)	Conc Calc (Copias)
13		Cruzi 5	Desconocido	36,38			
14		Cruzi 5	Desconocido	35,39			
15		Cruzi 5	Desconocido	34,02			
16		Rangeli 1	Desconocido		NEG (NTC)		
17		Rangeli 1	Desconocido		NEG (NTC)		
18		Rangeli 1	Desconocido		NEG (NTC)		
19		Rangeli 2	Desconocido		NEG (NTC)		
20		Rangeli 2	Desconocido		NEG (NTC)		
21		Rangeli 2	Desconocido		NEG (NTC)		
22		Rangeli 3	Desconocido		NEG (NTC)		
23		Rangeli 3	Desconocido		NEG (NTC)		
24		Rangeli 3	Desconocido		NEG (NTC)		
25		Rangeli 4	Desconocido		NEG (NTC)		
26		Rangeli 4	Desconocido		NEG (NTC)		
27		Rangeli 4	Desconocido		NEG (NTC)		

ES 2 857 513 T3

Nº	Color	Nombre	Tipo	Ct	Comentario Ct	Conc Dada (Copias)	Conc Calc (Copias)
28		Homo S. 1	Desconocido		NEG (NTC)		
29		Homo S. 1	Desconocido		NEG (NTC)		
30		Homo S. 1	Desconocido		NEG (NTC)		
31		Homo S. 2	Desconocido		NEG (NTC)		
32		Homo S. 2	Desconocido		NEG (NTC)		
33		Homo S. 2	Desconocido	37,10			
34		Homo S. 3	Desconocido		NEG (NTC)		
35		Homo S. 3	Desconocido		NEG (NTC)		
36		Homo S. 3	Desconocido		NEG (NTC)		
37		Homo S. 4	Desconocido		NEG (NTC)		
38		Homo S. 4	Desconocido		NEG (NTC)		
39		Homo S. 4	Desconocido		NEG (NTC)		
40		Muestra Neg. 1	Desconocido		NEG (NTC)		
41		Muestra Neg. 1	Desconocido		NEG (NTC)		
42		Muestra Neg. 1	Desconocido		NEG (NTC)		

ES 2 857 513 T3

Nº	Color	Nombre	Tipo	Ct	Comentario Ct	Conc Dada (Copias)	Conc Calc (Copias)
43		Muestra Neg. 2	Desconocido		NEG (NTC)		
44		Muestra Neg. 2	Desconocido		NEG (NTC)		
45		Muestra Neg. 2	Desconocido		NEG (NTC)		
46		Muestra Neg. 3	Desconocido		NEG (NTC)		
47		Muestra Neg. 3	Desconocido		NEG (NTC)		
48		Muestra Neg. 3	Desconocido		NEG (NTC)		
49		Muestra Neg. 4	Desconocido		NEG (NTC)		
50		Muestra Neg. 4	Desconocido		NEG (NTC)		
51		Muestra Neg. 4	Desconocido	35,17			
52		Negativo - H2O	Desconocido		NEG (NTC)		
53		Negativo - H2O	Desconocido		NEG (NTC)		
54		Tulahuen Positivo 1:100	Desconocido	23,09			
55		Tulahuen Positivo 1:1000	Desconocido	27,38			

Los valores determinados están confrontados entre sí en la Figura 2 en una gráfica.

5 Tal como muestran los datos precedentes, junto con la gráfica de la Figura 2, en todos los casos en los que se confirmaron ya mediante la secuenciación, secuencias de gérmenes de *Trypanosoma cruzi*, estos se mostraron en el intervalo CT esperado y, con ello, se detectaron de manera inequívoca. A diferencia de ello, todas las secuencias de gérmenes (relacionadas) de *Trypanosoma rangeli* fueron negativas en el ensayo.

Parte experimental: Parte 2:

Sensibilidad, especificidad

5 El diagnóstico técnico de laboratorio de la enfermedad de Chagas es un reto, en la medida en que no existe regla de oro alguna. Además de ello, el diagnóstico depende del estadio de la enfermedad. Así, se pueden establecer bien formas crónicas ya con ayuda de procedimientos serológicos (test rápido, ELISA, inmunofluorescencia, etc.), pero no formas agudas, indeterminantes o congénitas, así como recidivas o el control de una terapia que ha tenido lugar. A diferencia de los procedimientos de detección serológicos indirectos, aquí se aconsejan las detecciones directas del germen, p. ej., mediante RT-PCR.

A este respecto, se han intentado y evaluado muchos enfoques (véanse las publicaciones de Schijman et al, Qvarnström et al y otras). A modo de ejemplo, para muchas PCRs Qvarnström et al representaron para tres de las PCRs líderes, sensibilidades y especificidades:

	<b>kADN-PCR</b>	<b>18S ARNr PCR</b>	<b>TCZ-PCR</b>
<b>Sensibilidad</b>	78%	6%	63%
<b>Especificidad</b>	40%	100%	100%

10

(modificado según Qvarnström et al, 2012)

15 A este respecto, es destacable el colectivo de estudio examinado (119) que se componía predominantemente de adultos con una enfermedad de Chagas conocida, la cual había sido reactivada mediante inmunosupresión (después de un trasplante de órganos, SIDA), o había sido adquirida de forma congénita o por accidentes de laboratorio. En el caso de muchas personas de este colectivo eran de esperar parasitemias elevadas. A pesar de ello, los autores llegan a la conclusión de que con estas PCRs tiene lugar ciertamente una base diagnóstica, pero no puede establecerse diagnóstico fiable alguno, a no ser que la muestra se manifestara positiva en las tres PCRs.

·En el marco de un estudio en Colombia los autores de la invención estuvieron atentos al problema de la enfermedad de Chagas. Examinaron en total 1009 muestras de una zona de alta endemia en cuanto a Chagas.

20 De este colectivo, consistente en todas las clases de edad, personas sanas, personas enfermas de Chagas agudas, crónicas o crónicas-indeterminantes se secuenciaron aprox. 100 muestras PCR-positivas. Dado que todas las muestras TCZ y 18s-ARNr PCR positivas también eran kADN PCR positivas, se clonó y secuenció aquí el material amplificado de la kADN PCR. En 87 casos se consiguió la clonación y la secuenciación. Se encontraron 65 determinaciones secuencialmente aseguradas para *Trypanosoma cruzi*, 14 para *Trypanosoma rangeli* y 8 para *Homo sapiens*.

25

También se secuenciaron los materiales amplificados por PCR de seis muestras de las PCR nuevas desarrolladas. Todas ellas mostraron una detección positiva para *T. cruzi*. Una de estas muestras secuenciadas positivas era positiva solo en la nueva PCR y no fue detectada por ninguna de las otras tres PCRs.

30 Partiendo de estos resultados, los autores de la invención han calculado las sensibilidades y especificidades para el colectivo secuenciado para todas las PCRs en las mismas condiciones y se enumeran en la siguiente Tabla:

	<b>kADN-PCR</b>	<b>18S ARNr PCR</b>	<b>TCZ-PCR</b>	<b>PCR nueva desarrollada</b>
<b>Sensibilidad</b>	89,2%	1,5%	20,5%	92,3%
<b>Especificidad</b>	22,7%	100%	100%	100%

35 También se confirmaron aquí las buenas especificidades de las 18S ARNr y TCZ PCR - tal como se describió previamente por Qvarnström et al -. No obstante, las sensibilidades se manifestaron más bajas (muchos resultados falsos negativos). El motivo de ello podrían ser los diferentes colectivos. En el caso de reactivaciones, p. ej., las parasitemias son la mayoría de las veces elevadas, en el caso de una población media con transcurros predominantemente crónicos/crónico-indeterminantes, el número de los parásitos es sin embargo más bien bajo.

40 La kADN-PCR muestra una buena sensibilidad, pero se encuentra muy baja en la especificidad. Un motivo de ello son muchos resultados falsos positivos que se han de atribuir la mayoría de las veces a una reacción cruzada con *T. rangeli*. *T. rangeli* se considera como el pariente más próximo de *T. cruzi*, pero a diferencia de *T. cruzi* se considera apatógeno. La nueva PCR desarrollada muestra como únicas tanto buenas sensibilidades como especificidades. En este grupo no se clasificó como falso positivo muestra alguna y todas las negativas fueron reconocidas como correctamente negativas.

Datos de inter- e intra-ensayo

45 Para el inter-ensayo se utilizó el control positivo Tulahuen en una dilución de 1 : 100 y se testó en tres días diferentes en 10 muestras por cada progreso (22-24.6.15). El valor del coeficiente de variación ascendió a 1,86%.

Para el intra-ensayo se diluyeron 20 muestras del control positivo Tulahuen, en cada caso en una relación 1 : 100 y 1 : 10.000 y se evaluaron en un progreso. El valor del coeficiente de variación ascendió a 1,7% para la dilución de 1 : 100 y a 2,4% para la dilución de 1 : 10.000

Progreso de cebador-dímero

- 5 En un progreso de cebador-dímero (también denominado progreso de agua) se emplearon únicamente cebador, sonda, cloruro de magnesio, tampón y agua con el fin de reconocer interacciones de los distintos componentes del kit. Estos no se manifestaron en ninguna de las 30 muestras sometidas a ensayo.

Plásmido definido para la cuantificación

- 10 Con ayuda de un plásmido definido se estableció una curva patrón para la determinación de la cantidad de la parasitemia. Para ello, se amplificó, clonó y secuenció una muestra positiva ya conocida, al mismo tiempo se midió la concentración de plásmidos. Después de la confirmación renovada de la secuencia como *T. cruzi* y un resultado de medición de  $10^{11}$  plásmidos /  $\mu\text{l}$  en la muestra pudo determinarse, a través de una serie de dilución en un enfoque triple, la curva patrón. La medición de la serie de dilución, así como el establecimiento de la curva patrón tuvieron lugar tanto para la kADN-PCR (modificada por Qvarnström et al) como para la nueva PCR.

- 15 A continuación, se sometieron a ensayo dos muestras positivas conocidas en etapas de dilución logarítmicas en las dos PCRs arriba mencionadas.

Como límite de detección se describieron en la publicación de Schijman et al (2011)  $5 \times 10^{-3}$  parásitos/ml. En los exámenes realizados por los autores de la invención, para la kADN-PCR (modificada por Qvarnström et al) se comprobó un límite de detección de  $3 \times 10^{-2}$  parásitos/ml.

- 20 La nueva PCR desarrollada tiene un límite de detección de  $3 \times 10^{-4}$  gérmenes/ml.

Con ello, la nueva PCR desarrollada puede detectar incluso pequeñas parasitemias, con lo cual existe la posibilidad de mejorar el diagnóstico en el caso de infecciones agudas, congénitas, crónica-indeterminantes, así como controles de éxito de la terapia, reactivaciones bajo supresión inmune, rastreo antes de trasplantes de órganos o donaciones de sangre y medidas para combatir (p. ej., control del vector/reservorio, etc.).

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> Kann Simone
- <120> Oligonucleótidos y su uso
- <130> P 3000 WO
- 5 <150> DE102015113038.6
- <151> 07-08-2015
- <150> DE102015111267.1
- <151> 13-07-2015
- <160> 16
- 10 <170> BiSSAP 1.3.6
- <210> 1
- <211> 13
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
- <223> Oligonucleótido
- <400> 1
- ccccwccwcc vnd 13
- <210> 2
- 20 <211> 13
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido
- 25 <400> 2
- ccccacctcc ccg 13
- <210> 3
- <211> 15
- <212> ADN
- 30 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sonda de oligonucleótidos
- <400> 3
- cgaacccccw ccwyc 15
- 35 <210> 4
- <211> 15
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 40 <223> Sonda de oligonucleótidos
- <400> 4

cgaacccccca cctcc 15

<210> 5  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sonda de oligonucleótidos

<400> 5

caacccaat cgaacccccw ccwycvndtd gnmchwhy 38

10 <210> 6  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223>Cebador de oligonucleótidos

<400> 6

gcactatatt acaccaacc c 21

<210> 7  
 <211> 17  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador de oligonucleótidos

<400> 7

25 catgcawctc mcccgtm 17

<210> 8  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Cebador de oligonucleótidos

<400> 8

taaccaactg gcactatatt acaccaacc caat 34

<210> 9  
 35 <211> 38  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador de oligonucleótidos

40 <400> 9

- vbsbnrdwwk catgcawctc mcccgtmcat tatytsbn 38
- <210> 10  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Sonda de oligonucleótidos
- <400> 10
- cgaacccac ctcc 14
- 10 <210> 11  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 15 <223> Sonda de oligonucleótidos
- <400> 11
- caacccaat cgaacccwc cwycvnddm hwhy 34
- <210> 12  
 <211> 17  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Cebador de oligonucleótidos
- <400> 12
- 25 catgcatctc cccgta 17
- <210> 13  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>  
 <223> Cebador de oligonucleótidos
- <400> 13
- ggccagaatt catgcatctc cccgtacat tatttsta 38
- <210> 14  
 35 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Sonda de oligonucleótidos
- 40 <400> 14

cgaacccwc cwyc 14

<210> 15

<211> 38

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda de oligonucleótidos

<400> 15

caacccaat cgaacccca cctcccgta gaacattc 38

10 <210> 16

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Sonda de oligonucleótidos

<400> 16

caacccaat cgaacccac ctcccgaatc 34

**REIVINDICACIONES**

1. Oligonucleótidos

(i) con la secuencia SEQ ID NO 3 o

(ii) con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 3 o

5 (iii) con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 3 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

cgaacccc\*w ccwyc 15 SEQ ID NO 3,

en donde w representa a o t,  
y representa c o t; y  
10 \* representa una inserción "c".

2. Oligonucleótidos según la reivindicación 1, que comprenden o se componen de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 14 u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 14 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 14 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

15 cgaaccccwc cwyc 14 SEQ ID NO 14,

en donde w representa a o t,  
y representa c o t; o

que comprenden o se componen de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 4 u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 4 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 4 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3'.

cgaacccc\*a cctcc 15 SEQ ID NO 4,

en donde \* representa una inserción "c"; preferiblemente

que comprenden o se componen de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 10 u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 10 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 10 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

cgaaccccac ctcc 14 SEQ ID NO 10.

3. Oligonucleótidos según la reivindicación 1 o 2, que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 5, u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 5 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 5 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

caacccaat cgaacccc\*w ccwyc vnd\*\*d §nm#hwhy 38 SEQ ID NO 5,

en donde w representa a o t;  
35 m representa a o c;  
y representa c o t;  
v representa a o c o g;  
d representa a o g o t;  
h representa a o c o t;  
40 n representa a o c o g o t;  
\* representa la inserción "c";  
\*\* representa la inserción "t";  
§ representa la inserción "g", y  
# representa la inserción "c"; preferiblemente

45 que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 11 u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 11 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 11 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

caacccaat cgaaccccwc cwycvnddm hwhy 34 SEQ ID NO 11

50 en donde w representa a o t;  
m representa a o c;  
y representa c o t;

v representa a o c o g ;  
 d representa a o g o t ;  
 h representa a o c o t ;  
 n representa a o c o g o t ; o

5 que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 15 u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 15 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 15 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

caacccaat cgaacccc\*a cctcccg\*\*a §aa#attc 38 SEQ ID NO 15,

10 en donde \* representa la inserción "c";  
 \*\* representa la inserción "t";  
 § representa la inserción "g", y  
 # representa la inserción "c"; preferiblemente

15 que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 16 u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 16 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 16 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

caacccaat cgaaccccac ctcccgaatc 34 SEQ ID NO 16.

20 4. Oligonucleótidos de la SEQ ID NO 3 o SEQ ID NO 4 o SEQ ID NO 10 o SEQ ID NO 11 según una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, que presentan una o varias marcas en uno o en los dos de sus extremos 5' y/o extremos 3', preferiblemente en donde la una o las varias marcas es o son marcadores, más preferiblemente, la una o las varias marcas es o son marcadores o extintores de la fluorescencia.

25 5. Oligonucleótidos de la SEQ ID NO 3 o SEQ ID NO 4 o SEQ ID NO 5 o SEQ ID NO 10 o SEQ ID NO 11 o SEQ ID NO 14 o SEQ ID NO 15 o SEQ ID NO 16 según una o varias de las reivindicaciones 1 a 4, en combinación con uno o varios de otros oligonucleótidos del grupo cebador directo y cebador inverso.

30 6. Oligonucleótidos de la SEQ ID NO 3 o SEQ ID NO 4 o SEQ ID NO 5 o SEQ ID NO 10 o SEQ ID NO 11 o SEQ ID NO 14 o SEQ ID NO 15 o SEQ ID NO 16 según la reivindicación 5, en donde un cebador (1) comprende: una secuencia de oligonucleótidos de la SEQ ID NO 6 u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 6 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 6 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

gcactatatt acaccaacc c 21 SEQ ID NO 6

35 y/o en donde un cebador (2) comprende: una secuencia de oligonucleótidos de la SEQ ID NO 7 u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 7 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 7 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

catgcawctc mcccgtm 17 SEQ ID NO 7;

en donde w representa a o t; y  
 m representa a o c; y

40 comprende preferiblemente: oligonucleótidos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 12 u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 12 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 12 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

catgcatctc ccccgta 17 SEQ ID NO 12;

45 más preferiblemente, en donde el cebador (1) es un cebador directo y/o en donde el cebador (2) es un cebador inverso; o en donde el cebador (2) es un cebador directo y/o en donde el cebador (1) es un cebador inverso.

7. Oligonucleótidos según una de las reivindicaciones 5 o 6, que comprenden como cebador (1) secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO 8 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 8 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 8 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

taaccaactg gcatatatt acaccaaccc caat 34 SEQ ID NO 8

5 y/o que comprenden como cebador (2) secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO 9 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 9 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 9 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

vbsbnrdwwk catgcawctc mcccgtmcat taty\*bn 38 SEQ ID NO 9

en donde  
 10 s representa c o g;  
 w representa a o t;  
 r representa a o g;  
 y representa c o t;  
 k representa g o t;  
 v representa a o c o g;  
 d representa a o g o t;  
 15 b representa c o g o t;  
 n representa a o c o g o t; y  
 \* representa la inserción "s"; y

20 que comprenden preferiblemente: oligonucleótidos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 13 u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 13 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 13 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

ggccagaatt catgcatctc ccccgatcat tattt\*ta 38 SEQ ID NO 13,

en donde \* representa la inserción „s“;

más preferiblemente, en donde el cebador (1) es un cebador directo y/o en donde el cebador (2) es un cebador inverso, o en donde el cebador (2) es un cebador directo y/o en donde el cebador (1) es un cebador inverso.

25 8. Oligonucleótidos de las secuencias SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 y/o SEQ ID NO 16, según una o varias de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en la amplificación de secuencias de nucleótidos de gérmenes patógenos, preferiblemente para la amplificación exclusiva de secuencias de ADN de *Trypanosoma cruzi*, en una mezcla de ADN de distinta procedencia, de manera particularmente preferida mediante PRC, lo más preferiblemente mediante PCR en tiempo real.

30 9. Uso de los oligonucleótidos de las secuencias SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 y/o SEQ ID NO 16 según una o varias de las reivindicaciones 1 a 8, para la determinación de la presencia o ausencia de ADN de *Trypanosoma cruzi* en una muestra de un tejido corporal o de un fluido corporal de un ave de corral, un mamífero o un ser humano, lo más preferiblemente en una muestra de tejido o en una muestra de sangre o en una muestra de plasma o en una muestra de suero de un ser humano.

35 10. Uso de los oligonucleótidos de las secuencias SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 y/o SEQ ID NO 16 según una o varias de las reivindicaciones 1 a 8, para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en una muestra de un tejido corporal o de un fluido corporal de un ave de corral, un mamífero o un ser humano, lo más preferiblemente en una muestra de tejido o en una muestra de sangre o en una muestra de plasma o en una muestra de suero de un ser humano.

40 11. Oligonucleótidos, consistentes en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 2 u oligonucleótidos con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 2 u oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos opuesta a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO 2 con respecto a la dirección de lectura 5' → 3':

ccccacctcc ccg 13 SEQ ID NO 2.

45 12. Uso de un oligonucleótido según la reivindicación 11, para la diferenciación de la secuencia de gérmenes de *Trypanosoma cruzi* de secuencias de otros *Trypanosoma*, preferiblemente para la diferenciación de la secuencia de gérmenes de *Trypanosoma cruzi* de la secuencia de *Trypanosoma rangeli*.

50

Comparación de las secuencias de gérmenes

Resumen	Variantes NT	Indice	Referencia	AA	Referencia					
▶ 58.3	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 59.1	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 511.3	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 513.3	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 515.3	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 517.4	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 519.5	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 520.7	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 594B	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 509C	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 639G	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 643B	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 645A	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 53.3	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 675G	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 100D	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 101B	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 102E	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 103E	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 104A	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 105D	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 106E	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64
▶ 107E	TATATTACACCAACCCCAATCGAACCCCACTCCCTG-GAA-AAT-CCGCA-----AATTG-G-G-A---A-----AATAATGTAC	11	.....	40	.....	54	.....	50	.....	64

Figura 1

Datos determinados:

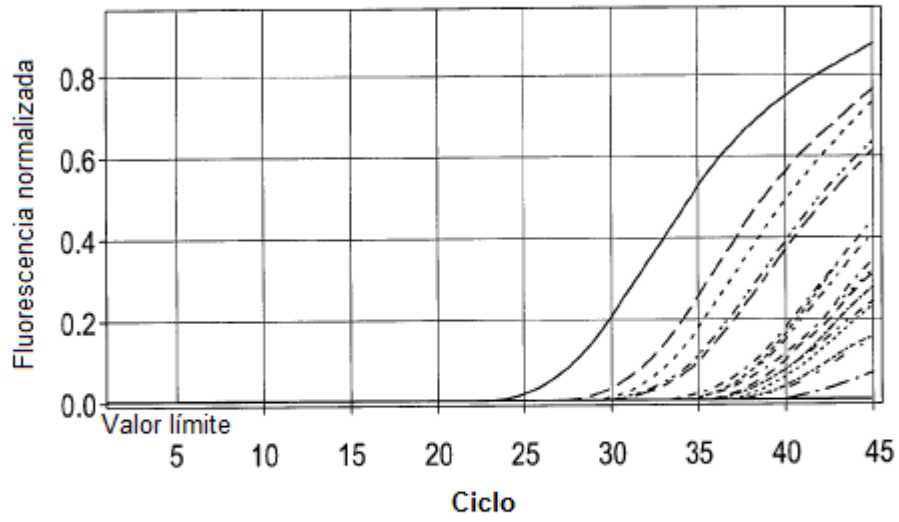


Figura 2