



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 324 125**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98926340 .5**

96 Fecha de presentación : **04.06.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **0991782**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2000**

54 Título: **Cebadores y sondas de ácidos nucleicos para detectar VIH-1 y VIH-2.**

30 Prioridad: **16.06.1997 US 876546**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.07.2009

73 Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**
Chad 0377/AP6D-2, 100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-3500, US

72 Inventor/es: **Kroeger, Paul, E.;**
Abravaya, Klara;
Esping, Claudia, A.;
Gorzowski, Jacek, J.;
Hoenle, Robert, J. y
Moore, Jennifer J.

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 324 125 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

Cebadores y sondas de ácidos nucleicos para detectar VIH-1 y VIH-2.

5 Campo de la invención

La presente invención hace referencia a oligonucleótidos y métodos para detectar VIH-1.

Antecedentes de la invención

10 Los virus clasificados como VIH contienen ARN como su información genética y la infectividad del VIH depende de la capacidad del virus para insertar su información genética en el ADN de un hospedador. Para insertar su información genética y, por tanto, infectar con éxito a un hospedador, un virus VIH debe convertir su material genético (ARN) a ADN para que la información genética del VIH sea compatible con la del hospedador. Aparentemente, el VIH es exitoso convirtiendo su ARN en ADN, dada la prevalencia del SIDA. Sin embargo, aunque el virus pueda convertir con éxito ARN a ADN, la conversión rara vez es exacta. En otras palabras, la copia de ADN del ARN viral no siempre es exacta y puede divergir del ARN viral en varios pares de bases. Por tanto, aunque un hospedador pueda estar infectado inicialmente con una única partícula viral, después de varias rondas de replicación, el hospedador puede estar infectado con una población de virus genéticamente diversa.

20 Aunque el VIH no está uniformemente clasificado, en general se acepta que VIH-1 y VIH-2 son virus distintos. Dentro de cada una de estas clasificaciones virales existen varios grupos o subtipos. Por ejemplo, dentro de la clasificación de VIH-1, se encuentra el “grupo M”, que se clasifica adicionalmente en los subtipos A-F, y el “grupo O”. Por el contrario, VIH-2 contiene los subtipos A-E. Los subtipos de VIH-1 y de VIH-2 se subdividen adicionalmente todavía en categorías demasiado numerosas para mencionarlas en este contexto. Sin embargo, vale la pena mencionar que todas estas divisiones se basan en la varianza genética entre los virus y, de acuerdo con la teoría taxonómica, muchos de estos virus son la progenie de un único virus. Por tanto, los numerosos tipos y subtipos demuestran la naturaleza altamente mutable del VIH y la variabilidad genética del genoma del VIH.

30 La variabilidad genética del virus puede atribuirse a la ineficacia con la que el virus convierte su ARN en ADN, como se mencionó anteriormente. Otra teoría relativa a la variabilidad genética del virus, es que los hospedadores pueden infectarse con múltiples poblaciones diferentes de VIH (que, como se mencionó anteriormente, pueden surgir de una infección por un único virus) y, en el transcurso de la replicación y empaquetamiento de la información genética viral, fragmentos de un genoma viral pueden recombinarse con fragmentos de otro genoma viral. Por tanto, después del empaquetamiento del genoma recombinado, se forma un virus genéticamente distinto. Independientemente de la forma por la que el virus muta, está claro que los virus conocidos como VIH tienen genomas que son altamente mutables y están, por tanto, constantemente cambiando. Esto ofrece a los que buscan métodos de detección del virus basados en su información genética una diana en constante cambio.

40 Aunque se conoce que ciertas regiones del genoma del VIH están conservadas, esto no quiere decir que estas regiones sean inmunes a mutaciones, particularmente, si las mutaciones en estas regiones no afectan a la estructura de la proteína codificada por estas regiones. Por tanto, el desarrollo de reactivos y métodos para detectar VIH basados en su información genética es un desafío continuo.

45 Resumen de la invención

La presente invención proporciona un conjunto de cebador/sonda 1 (SEC. ID. N° 2, 3 y 4) para detectar VIH-1 (es decir, los diversos subtipos de VIH-1).

50 La presente invención, además, proporciona un método de detección del VIH en una muestra que comprende los pasos de (a) formar una mezcla de reacción que comprende reactivos de amplificación de ácido nucleico, conjunto de cebador/sonda 1 (SEC ID N° 2, 3 y 4) y una muestra que contiene una secuencia diana del VIH; (b) someter la mezcla a condiciones de amplificación para generar al menos una copia de una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana; (c) hibridar la sonda con la secuencia de ácidos nucleicos complementaria a la secuencia diana; para así formar un híbrido que comprenda la sonda y la secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana; y (d) detectar el híbrido como indicativo de la presencia de VIH en la muestra.

60 El formato preferido de RT PCR comprenderá los mismos pasos que los mencionados anteriormente, pero los reactivos de amplificación comprenderán una enzima con actividad transcriptasa inversa. Además, de acuerdo con cualquiera de los métodos proporcionados en este documento, el paso (b) puede repetirse múltiples veces, preferiblemente entre 10 y 100, para incrementar el número de copias de la secuencia diana. Los especialistas en la técnica entenderán que el paso (b) puede repetirse a través de termociclado de la mezcla de reacción.

65 En una realización preferida, los reactivos de amplificación incluyen una enzima con actividad transcriptasa inversa y el método además, comprende el paso, después del paso (a) y previo al paso (b), de formación de un ADNc de un genoma de VIH.

ES 2 324 125 T3

La presente invención, además, proporciona un kit que comprende el conjunto de cebador/sonda 1 (SEC ID N° 2, 3 y 4) y agentes de amplificación, preferiblemente en el que los reactivos de amplificación comprenden una enzima con actividad transcriptasa inversa.

Descripción detallada de la invención

Como se indica más arriba, el método y kit de la invención emplean un conjunto de cebador/sonda (SEC ID N° 2, 3 y 4) para detectar VIH-1. Aunque en este documento se indican otros conjuntos de cebador/sonda con propósitos comparativos, no son realizaciones de la presente invención.

Los conjuntos de cebador/sonda proporcionados en este documento comprenden dos cebadores y, al menos, una sonda. Estos conjuntos de cebador/sonda pueden emplearse de acuerdo con las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Por tanto, los cebadores de cualquier conjunto de cebador/sonda particular pueden emplearse para amplificar una secuencia diana. En la mayoría de los casos, la sonda hibrida con las copias de la secuencia diana generada por uno de los cebadores y, generalmente, facilita la detección de cualquiera de las copias de la secuencia diana generada en el transcurso de la reacción de amplificación. Todos los conjuntos de cebador/sonda pueden emplearse de acuerdo con los procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos para detectar específica y sensiblemente VIH-1 del grupo M y O, así como los diversos subtipos de VIH-2. En la Tabla 1, abajo, se presentan conjuntos de cebador/sonda para detectar subtipos de VIH-1 y en la Tabla 2, abajo, se presentan conjuntos de cebador/sonda para detectar subtipos de VIH-2.

TABLA 1

Conjunto de Cebador/Sonda	Secuencia (5'-3')	SEC. ID. N°
1	ATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGT	2
	CCTGCACTGTACCCCCCAATCC	3
	ACAGCAGTACAAATGGCA	4
2	GGAGCAGAACTTTCTATGTAGATGG	5
	CATATTGTGAGTCTGTTACTATGTTTACT	6
	TAGGAAAAGCAGGATATG	7
3	GGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGT	8
	GGCCATTGTTTAACTTTTGGGCCATCCA	9
	ATTAGTCCTATTGAACTGT	10
	ATAAGCCCCATAGCC	11
4	CCTAGTATAACAATGAGACACCAGG	12
	GATCCTACATACAAGTCATCCATGTA	13
	GGATGGAAAGGATCACCA	14

TABLA 2

Conjunto de Cebador/Sonda	Secuencia (5'-3')	Secuencia ID nº
5	ACTGATGGCAGTTCATTGCATGAATTTTAAAAG	16
	TTCCACAGCTGATCTCTGCCTTCTCTG	17
	CAGAACAAGAAATACAATTC	18
6	CCTCAATTCTCTCTTTGGAAAAGACC	19
	AAATGTTGATTGGGGTATCTCCTGTC	20
	CCAAAAATAGTAGGGGG	21
	ATAGTAGCAGGAATAGA	22
7	CAATAGTAGCAGGAATAGAGTTAGG	23
	AAATGTTGATTGGGGTATCTCCTGTC	20
	CCAAAAATAGTAGGGGG	21
8	ACTGATGGCAGTTCATTGCATGAATTTTAAAAG	16
	CACAGCTGATCTCTGCCTTCTCTGTAATAGAC	24
	CAGAACAAGAAATACAATTC	18

Como se refirió anteriormente, los cebadores incluidos en los conjuntos de cebador/sonda pueden usarse para cebar síntesis de copias de una secuencia diana del VIH-1 en el caso de las SEC ID Nº 2, 3, 5, 6, 8, 9, 12 y 13; y copias de una secuencia diana VIH-2 en el caso de las SEC ID Nº 16, 17, 19, 20, 23 y 24. Las restantes SEC ID Nº (SEC ID Nº 4, 7, 10, 11, 14, 18, 21 y 22) hibridan con los productos de amplificación de una o ambas secuencias cebadoras encontradas en el mismo conjunto de cebador/sonda. Por ejemplo, el conjunto de cebador/sonda 6 es específico para VIH-2 en la medida en que las SEC. ID. Nº 19 y 20 actúan como cebador en la síntesis de la secuencia diana del VIH-2 y que las SEC. ID. Nº 21 y 22 hibridan con los productos de amplificación producidos por las SEC. ID. Nº 19 y 20. Por tanto, las secuencias sonda son también específicas para los diversos subtipos de VIH-1 y de VIH-2.

Las secuencias cebadoras comprenden, generalmente, ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). Las secuencias sonda, por el contrario, pueden comprender ARN o ADN o análogos de ácidos nucleicos tales como análogos de ácidos nucleicos sin carga incluyendo, pero no exclusivamente, ácidos nucleicos peptídicos (ANP) que se recogen en la solicitud de patente internacional WO 92/20702 o análogos morfolino descritos en las patentes de Estados Unidos nº 5.185.444, 5.034.506 y 5.142.047 incorporadas como referencia en este documento. Dichas secuencias pueden sintetizarse rutinariamente usando una diversidad de técnicas actualmente disponibles. Por ejemplo, una secuencia de ADN puede sintetizarse usando la química convencional de nucleótido-fosforamidita y los instrumentos disponibles de Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA); DuPont, (Wilmington, DE); o Milligen, (Bedford, MA). De la misma forma, y cuando se desee, las secuencias pueden marcarse usando metodologías bien conocidas en la técnica tales como las que se describen en las solicitudes de patente de Estados Unidos nº 5.464.746; 5.424.414; y 4.948.882, todas ellas incorporadas como referencia en este documento.

El término “marcador” tal y como se utiliza en este documento hace referencia a la molécula o fracción que tiene la propiedad o característica que permite la detección. Un marcador puede ser directamente detectable, por ejemplo, radioisótopos, fluoróforos, quimioluminóforos, enzimas, partículas coloidales, micropartículas fluorescentes y similares; o un marcador puede ser detectable indirectamente, como, por ejemplo, miembros específicos de unión. Se entenderá que los marcadores directamente detectables pueden requerir componentes adicionales tales como, por ejemplo, sustratos, reactivos iniciadores de reacción, luz y similares para posibilitar la detección del marcador. Cuando se usan marcadores indirectamente detectables, normalmente se usan en combinación con un “conjugado”. Un conjugado es, típicamente, un miembro de unión específica que se ha sido unido o acoplado a un marcador de detección directa. Las técnicas químicas de acoplamiento para la síntesis de un conjugado son bien conocidas y pueden incluir, por ejemplo, cualquier medio químico y/o físico que no interfiera con la propiedad específica de unión del miembro específico de unión o con las propiedades de detección del marcador. Tal y como se utiliza en este documento, “miembro específico de unión” hace referencia a un miembro de un par de unión, por ejemplo, dos moléculas distintas donde una de las dos a través de, por ejemplo, uniones químicas o físicas se une específicamente a la otra. Además de pares de unión específica antígeno-anticuerpo, otros pares de unión específica incluyen, pero no exclusivamente, avidina y bio-

tina; haptenos y anticuerpos específicos para estos haptenos; secuencias complementarias de nucleótidos; cofactores o sustratos enzimáticos y enzimas; y similares.

El término “muestra de ensayo” usado en este documento hace referencia a cualquier cosa susceptible de contener una secuencia diana para VIH. La muestra de ensayo es o puede proceder de cualquier fuente biológica, como por ejemplo, sangre, fluido de lentes oculares, líquido cefalorraquídeo, leche, líquido ascítico, fluido sinovial, fluido peritoneal, líquido amniótico, tejido, caldos de fermentación, cultivos celulares y similares. La muestra puede usarse (i) directamente como se obtiene de la fuente o (ii) siguiendo un pretratamiento para modificar el carácter de la muestra. Así, la muestra de ensayo puede pretatarse antes del uso, por ejemplo, preparando plasma sanguíneo, lisado celular o partículas virales, preparando líquido a partir de material sólido, diluyendo fluidos viscosos, filtrando líquidos, destilando líquidos, concentrando líquidos, inactivando componentes interferentes, añadiendo reactivos, purificando ácidos nucleicos y similares.

El término “secuencia diana” usado en este documento hace referencia a una secuencia de ácidos nucleicos que se detecta, amplifica o ambas cosas usando los conjuntos de cebador/sonda proporcionados en este documento. Adicionalmente, aunque el término secuencia diana se refiere, en ocasiones, a monocatenario, los especialistas en la técnica reconocerán que la secuencia diana puede en realidad ser bicatenaria. Así, en los casos en los que la secuencia diana es bicatenaria, las secuencias cebadoras de la presente invención amplificarán las dos hebras de la secuencia diana.

Como se mencionó anteriormente, las secuencias cebadoras de cualquier conjunto de cebador/sonda en particular (por sí mismos o con oligonucleótidos adicionales) pueden usarse como cebadores de amplificación de acuerdo con procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos bien conocidos en la técnica. Dichas reacciones incluyen, pero no exclusivamente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita en las patentes de Estados Unidos 4.683.195 y 4.683.202, la reacción en cadena de la ligasa (LCR) descrita en el documento EP-A-320 308, y gap LCR (GLCR) descrita en la patente de Estados Unidos con n° de serie 5.427.930, incorporadas como referencia en este documento. Genéricamente, estas reacciones de amplificación ejemplificadas generan múltiples copias de una secuencia diana de ADN.

De acuerdo con la presente invención, la secuencia diana podría, en efecto, ser ADN; por otro lado, gracias a la naturaleza ribonucleica del genoma del VIH, los conjuntos de cebador/sonda podrían emplearse de acuerdo con un formato “RT PCR” que se describe en las patentes de Estados Unidos n° 5.322.770 y 5.310.652, incorporadas como referencia en este documento. En resumen, el formato RT PCR proporciona un método para transcribir una hebra de ADN a partir de una secuencia diana de ARN. La hebra de ADN copiada, transcrita a partir del ARN diana, se denomina comúnmente “ADN” que, posteriormente, puede servir como molde para la amplificación por cualquiera de los métodos mencionados anteriormente. El proceso de generación de ADNc comparte muchos de los principios de hibridación y extensión en torno a otros métodos de amplificación tales como PCR, pero la enzima empleada debe tener actividad transcriptasa inversa. Las enzimas que tienen actividad transcriptasa inversa, así como el proceso RT PCR, son bien conocidos y, por tanto, no precisan mayor discusión. Adicionalmente, son también conocidos otros métodos para la síntesis de ADNc e incluyen la solicitud de patente de Estados Unidos con n° de serie 08/356.287 de propiedad común, presentada el 22 de febrero de 1995, incorporada como referencia en este documento.

De acuerdo con una realización preferida, los conjuntos de cebador/sonda se emplean en la reacción de amplificación “PCR de hibridación de oligonucleótidos” (también denominada en este documento “OH PCR”), como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos con n° de serie 08/514.704, presentada el 14 de agosto de 1995, incorporada como referencia en este documento. En resumen, los reactivos empleados en el método preferido comprenden al menos un conjunto de cebador/sonda (denominados en este documento conjuntos de cebador/sonda 1-8), así como otro reactivos para llevar a cabo una reacción de amplificación. “Otros reactivos para llevar a cabo una reacción de amplificación” o “reactivos de amplificación de ácidos nucleicos” incluyen reactivos que son bien conocidos y pueden incluir, pero no exclusivamente, una enzima con actividad polimerasa; cofactores enzimáticos tales como magnesio; sales; dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD); y desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) tales como, por ejemplo, desoxiadenina trifosfato, desoxiguanina trifosfato, desoxicitosina trifosfato y desoxitimina trifosfato.

El método preferido generalmente comprende los pasos de (a) formar una mezcla de reacción que contiene reactivos de amplificación de ácidos nucleicos, al menos un conjunto de cebador/sonda de la presente invención y una muestra de ensayo susceptible de contener una secuencia diana; (b) someter la mezcla a condiciones de amplificación para generar al menos una copia de una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a la secuencia diana; (c) hibridar la sonda con la secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana, para así formar un híbrido que comprenda la sonda y la secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana; y (d) detectar el híbrido como indicio de la presencia de la secuencia diana (VIH) en la muestra. Se entenderá que el paso (b) del anterior método puede repetirse varias veces antes del paso (c) por termociclado de la mezcla de reacción entre 10 y 100 veces, más típicamente entre 20 a 60 veces, como es bien conocido en la técnica.

Las condiciones de amplificación se definen, generalmente, como condiciones que promueven el alineamiento y la extensión de una o más secuencias de ácido nucleico. Es bien conocido en la técnica que dicho alineamiento depende, de manera bastante predecible, de varios parámetros incluyendo la temperatura, fuerza iónica, longitud de la secuencia, complementariedad y contenido en G:C de las secuencias. Por ejemplo, la disminución de la temperatura en el entorno de las secuencias de ácido nucleico complementarias promueve el alineamiento. Para cualquier conjunto dado de secuencias, la temperatura de fusión, o T_m , puede estimarse por cualquiera de varios métodos conocidos.

Típicamente, las aplicaciones de diagnóstico utilizan temperaturas de hibridación próximas a la temperatura de fusión (por ejemplo, dentro de 10°C). La fuerza iónica o concentración “salina” también influye en la temperatura de fusión, ya que los cationes pequeños tienden a estabilizar la formación de dúplex anulando la carga negativa del esqueleto fosfodiéster. Las concentraciones salinas típicas dependen de la naturaleza y valencia del catión, pero son de fácil comprensión para los especialistas en la técnica. De forma similar, se sabe que un alto contenido en G:C y una elevada longitud de secuencia estabilizan la formación de dúplex, ya que los apareamientos G:C implican 3 enlaces de hidrógeno mientras que los apareamientos A:T sólo implican dos y, además, las secuencias más largas tienen más enlaces de hidrógeno que mantienen unidas a las secuencias. En consecuencia, un alto contenido en G:C y secuencias de mayor longitud influyen en las condiciones de hibridación elevando la temperatura de fusión.

Una vez que se han seleccionado las secuencias para una aplicación de diagnóstico dada, se conocerán el contenido en G:C y la longitud y se tendrán en cuenta para determinar precisamente qué condiciones de hibridación se realizarán. Como típicamente se optimiza la fuerza iónica para la actividad enzimática, el único parámetro que queda por variar es la temperatura. Por lo general, se selecciona una temperatura de hibridación próxima o igual a la T_m de los cebadores o de la sonda. Así, la obtención de condiciones de hibridación adecuadas para un conjunto de cebador/sonda particular es una práctica común para un especialista en la técnica.

De acuerdo con el método OH PCR, es preferible seleccionar cebadores, sondas y condiciones de reacción tales que la secuencia sonda tenga una temperatura de fusión menor que las secuencias cebadoras, de modo que, después de someter la mezcla de reacción a condiciones de amplificación, se produzcan copias de la secuencia diana o de su complementaria (denominada como alternativa amplicón) a una temperatura por encima de la T_m de la sonda. Después de sintetizar dichas copias, se desnaturalizan y la mezcla se enfría para dar lugar a la formación de híbridos entre las sondas y cualquiera de las copias de la secuencia diana o de su complementaria. Preferiblemente, la velocidad de disminución de la temperatura desde la temperatura de desnaturalización hasta una temperatura a la que las sondas se unirán a copias monocatenarias es bastante rápida, por ejemplo, entre aproximadamente 8 y aproximadamente 15 minutos, preferiblemente menor de 2 minutos. Dicho enfriamiento rápido favorece la formación de híbridos entre las copias de la secuencia diana y la sonda en lugar de, por ejemplo, la formación de híbridos entre hebras complementarias del amplicón.

En casos en los que se emplean marcadores para detectar productos de secuencias cebadoras, las secuencias cebadoras se marcan con un marcador de captura o un marcador de detección. La secuencia sonda se usa para hibridar con la secuencia generada por la secuencia cebadora y, normalmente, hibrida con una secuencia que no incluye la secuencia cebadora. De forma similar a la secuencia cebadora, la secuencia sonda se marca también con un marcador de captura o de detección con la salvedad de que, cuando el cebador se marca con un marcador de captura, la sonda se marca con un marcador de detección y viceversa. Los marcadores de detección tienen la misma definición que los “marcadores” previamente definidos y los “marcadores de captura” se usan normalmente para separar productos de extensión, y las sondas asociadas con cualquiera de dichos productos, de otros reactivos de amplificación. Miembros específicos de unión (como se han definido previamente) son adecuados para este propósito. Además, las sondas usadas de acuerdo con este método se bloquean preferiblemente en sus extremos 3' para que no se extiendan en condiciones de hibridación. Los métodos para prevenir la extensión de una sonda son bien conocidos y son una cuestión de elección para los especialistas en la técnica. Típicamente, la adición de un grupo fosfato al extremo 3' de la sonda bastará para bloquear la extensión de la sonda.

Después de la formación de híbridos de secuencia copia/sonda, los marcadores diferenciales (por ejemplo, marcadores de captura y detección) en la secuencia copia y la secuencia sonda pueden usarse para separar y detectar dichos híbridos. Preferiblemente, la detección se lleva a cabo de acuerdo con los protocolos usados por la instrumentación Abbott LCx[®] comercialmente disponible (Abbott Laboratories; Abbott Park, IL).

Como se discutió previamente, la secuencia diana puede ser ADN o la secuencia diana puede estar incrustada dentro del genoma de VIH y, por tanto, la secuencia diana puede estar en forma de ARN. En los casos en los que la secuencia diana es parte del genoma de VIH, es preferible incluir una enzima con actividad transcriptasa inversa como parte de los llamados reactivos de amplificación de ácidos nucleicos para hacer posible la producción de ADNc para su posterior amplificación. De acuerdo con esta realización, las secuencias cebadoras también sirven como cebadores para la síntesis de ADNc. Aunque la invención contempla distintos pasos de producción de ADNc y, posteriormente, de amplificación y detección de secuencias amplificadas de ADNc, se entenderá que estos procesos pueden tener lugar simultáneamente en una única mezcla de reacción de amplificación.

De acuerdo con otra realización, VIH-1 y VIH-2 pueden detectarse simultáneamente en una única reacción usando una combinación de dos conjuntos de cebador/sonda (es decir, uno seleccionado de los conjuntos de cebador/sonda específicos de VIH-1 y el otro seleccionado de los conjuntos de cebador/sonda específicos de VIH-2). Por ejemplo, una muestra de ensayo podría ponerse en contacto con conjuntos de cebador/sonda 1 y 8 junto con reactivos de amplificación, que pueden o no incluir una enzima con actividad transcriptasa inversa, para amplificar y detectar la presencia de VIH-1 y de VIH-2 en una muestra de ensayo.

Los oligonucleótidos de la presente invención también pueden proporcionarse como parte de un kit útil para detectar VIH-1. Los kits comprenden uno o más recipientes adecuados que contienen el conjunto de cebador/sonda de acuerdo con la presente invención, una enzima que tiene actividad polimerasa, desoxinucleótidos trifosfato y, opcionalmente, una enzima que tiene actividad transcriptasa inversa. Normalmente, al menos una secuencia lleva un marcador, pero la detección es posible sin esto.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos demuestran la detección de varios subtipos de VIH-1 y VIH-2 usando los conjuntos de cebador/sonda proporcionados en este documento. Estos cebadores y sondas de ADN que comprenden los conjuntos de cebador/sonda se identifican como SECUENCIA ID N° 2, SECUENCIA ID N° 3, SECUENCIA ID N° 4, SECUENCIA ID N° 5, SECUENCIA ID N° 6, SECUENCIA ID N° 7, SECUENCIA ID N° 8, SECUENCIA ID N° 9, SECUENCIA ID N° 10, SECUENCIA ID N° 11, SECUENCIA ID N° 12, SECUENCIA ID N° 13, SECUENCIA ID N° 14, SECUENCIA ID N° 16, SECUENCIA ID N° 17, SECUENCIA ID N° 18, SECUENCIA ID N° 19, SECUENCIA ID N° 20, SECUENCIA ID N° 21, SECUENCIA ID N° 22, SECUENCIA ID N° 23, SECUENCIA ID N° 24. Las secuencias SECUENCIA ID N° 2, SECUENCIA ID N° 3, SECUENCIA ID N° 4, SECUENCIA ID N° 5, SECUENCIA ID N° 6, SECUENCIA ID N° 7, SECUENCIA ID N° 8, SECUENCIA ID N° 9, SECUENCIA ID N° 10, SECUENCIA ID N° 11, SECUENCIA ID N° 12, SECUENCIA ID N° 13, SECUENCIA ID N° 14 son específicas para VIH-1. Una secuencia diana representativa de VIH-1 (subtipo B, cepa MN) se denomina en este documento SEC ID N° 1. Las secuencias SECUENCIA ID N° 16, SECUENCIA ID N° 17, SECUENCIA ID N° 18, SECUENCIA ID N° 19, SECUENCIA ID N° 20, SECUENCIA ID N° 21, SECUENCIA ID N° 22, SECUENCIA ID N° 23 y SECUENCIA ID N° 24 son específicas para VIH-2. Una secuencia diana representativa de VIH-2 (subtipo A, cepa NIH-Z) se denomina en este documento SEC ID N° 15. Todos los cebadores y sondas son secuencias consenso derivadas de 31 VIH-1 del grupo M (subtipos A, B y D) y aislados del grupo O y 14 aislados de VIH-2 de cada uno de los subtipos A y B para las secuencias del VIH-2.

En los siguientes ejemplos, las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, SEC ID N° 12 y SEC ID N° 13 se usan como cebadores consenso de amplificación específicos para la secuencia diana de VIH-1. La SEC ID N° 4, SEC ID N° 7, SEC ID N° 10, SEC ID N° 11 y SEC ID N° 14 se usan como sondas consenso de hibridación interna para el producto de amplificación del VIH-1. La SEC ID N° 16, SEC ID N° 17, SEC ID N° 19, SEC ID N° 20, SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24 se usan como cebadores de amplificación consenso específicos para la secuencia diana de VIH-2 y las SEC ID N° 18, SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22 se usan como sondas consenso de hibridación interna para el producto de amplificación de VIH-2.

Ejemplo 1

Preparación de cebadores y sondas para VIH

A. *Cebadores consenso para VIH-1 y para VIH-2.* Se diseñaron cebadores consenso para detectar todos los subtipos conocidos de VIH-1 y VIH-2 por PCR con hibridación de oligonucleótidos. Estos cebadores fueron las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, SEC ID N° 12 y SEC ID N° 13 para VIH-1, y SEC ID N° 16, SEC ID N° 17, SEC ID N° 19, SEC ID N° 20, SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24 para VIH-2. Las secuencias de los cebadores se sintetizaron usando la metodología estándar de síntesis de oligonucleótidos y se haptenizaron con adamantino en sus extremos 5' usando acoplamiento con cianoetil fosforamidita convencional como se describe en la patente de Estados Unidos n° 5.424.414 incorporada como referencia en este documento.

B. *Sondas consenso de VIH-1 y VIH-2.* Se diseñaron sondas consenso para hibridarlas con la secuencia diana amplificada de VIH por hibridación de oligonucleótidos. Estas sondas fueron las SEC ID N° 4, SEC ID N° 7, SEC ID N° 10, SEC ID N° 11 y SEC ID N° 14 para VIH-1, y las SEC ID N° 18, SEC ID N° 21 y SEC ID N° 22 para VIH-2. Se sintetizaron secuencias sonda usando la metodología convencional de síntesis de oligonucleótidos, se haptenizaron con 2 carbazoles en el extremo 5' usando la química de acoplamiento de cianoetil fosforamidita convencional como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.464.746 (incorporada como referencia en este documento) y se bloquearon con fosfato en el extremo 3'.

Ejemplo 2

Sensibilidad de la Detección de VIH-1

Se ha notificado que el subtipo B de VIH-1 es la cepa más común de VIH-1 encontrada en Europa y Estados Unidos, por lo que se usó para evaluar la sensibilidad de los diferentes conjuntos consenso de cebador/sonda de VIH-1. Se aisló ARN a partir de viriones de subtipo B de VIH-1 purificado en gradiente (VIH-1_{MN}, Advanced Biotechnologies Inc. Columbia, MD) usando el procedimiento de extracción de ARN de Qiagen y la metodología de columna descrita por el fabricante (Qiagen, Frankfurt, Germany). El ARN se cuantificó en copias de ARN por mililitro y se diluyó en ARN ribosomal a 1 ng/μl hasta niveles adecuados para la detección.

Se evaluaron cuatro conjuntos de cebador/sonda consenso distintos para VIH-1: en el conjunto n° 1 se usaron las SEC ID N° 2 y 3 como cebadores y la SEC ID N° 4 como sonda, en el conjunto n° 2 se usaron las SEC ID N° 5 y 6 como cebadores y la SEC ID N° 7 como sonda, en el conjunto n° 3 se usaron las SEC ID N° 8 y 9 como cebadores y las SEC ID N° 10 y 11 como sondas, en el conjunto n° 4 se usaron las SEC ID N° 12 y 13 como cebadores y la SEC ID N° 14 como sonda. Todas las secuencias se prepararon como se describe en el ejemplo 1.

Las diluciones del ARN de VIH-1 purificado se sometieron a transcripción inversa, se amplificaron por PCR y se detectaron usando los cuatro conjuntos de cebador/sonda consenso de VIH-1 en reacciones separadas. La RT PCR se llevó a cabo usando Bicine 50 mM, pH 8,25, acetato potásico 115 mM, EDTA 0,5 mM, glicerol al 8%, albúmina de

ES 2 324 125 T3

5 suero bovino (BSA) a 10 $\mu\text{g/ml}$ y azida sódica al 0,02%. La polimerasa recombinante de *Thermus thermophilus* se utilizó a una concentración de 5 unidades/reacción, con dNTP (dATP, dGTP, dTTP y dCTP) presentes a una concentración final de 0,15 mM cada uno. Los cebadores se usaron a una concentración de 500 nM cada uno, y las sondas a una concentración de 10 nM cada una. Se usó una concentración final de MnCl_2 2,5 mM en un volumen total de reacción de 0,2 ml, con un volumen de muestra de 25 a 50 μl . El control negativo estaba compuesto por 100 ng de ARN ribosomal por reacción.

10 Las mezclas de reacción se sometieron a transcripción inversa y se amplificaron en un termociclador Perkin-Elmer 480. Las mezclas de reacción primeramente se incubaron a 62°C durante 30 minutos para transcribir de manera inversa el ARN, seguido de 30 segundos a 94°C. Después se inició la amplificación por PCR a través de un protocolo "touchdown" o "step-down" específico para ayudar a la rigurosidad de la reacción en las primeras etapas de la amplificación. Esto utilizó 8 ciclos como sigue: 1 ciclo de 70°C durante 80 segundos, a continuación 94°C durante 30 segundos seguido de un ciclo de 69°C durante 80 segundos, después 94°C durante 30 segundos, seguido de 1 ciclo de 68°C durante 80 segundos, luego 94°C durante 30 segundos seguido de 1 ciclo de 67°C durante 80 segundos, luego 94°C durante 30 segundos seguido de 1 ciclo de 66°C durante 80 segundos, luego 94°C durante 30 segundos seguido de un ciclo de 65°C durante 80 segundos, luego 94°C durante 30 segundos seguido de un ciclo de 64°C durante 80 segundos, luego 94°C durante 30 segundos seguido de un ciclo de 63°C durante 80 segundos y después 94°C durante 30 segundos. Se consiguió una mayor amplificación con 35 ciclos, siendo cada uno de 62°C durante 80 segundos y posteriormente 94°C durante 30 segundos. Después de que las mezclas de reacción se termociclaran, las mezclas se mantuvieron a 97°C durante 15 minutos y la hibridación olido-sonda se consiguió disminuyendo la temperatura a 4°C antes de que transcurrieran 2 minutos. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta la detección de productos de reacción.

25 Los productos de reacción se detectaron en el sistema Abbott LCx® (disponible en Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Una suspensión de micropartículas recubiertas de anticuerpo anticarbazol y un conjugado de anticuerpo anti-adamantano/fosfatasa alcalina (todos ellos disponibles comercialmente en Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) se usaron en conjunto con el LCx® para capturar y detectar los productos de reacción. El sustrato enzimático usado fue metil-umbeliferil-fosfato (MUP), midiéndose la proporción de conversión de MUP en MU (metil-umbeliferona) y presentándose como cuentas/segundo/segundo (c/s/s).

30 Los datos de este experimento se presentan en la Tabla 3 y muestran la detección de VIH-1 de subtipo B a concentraciones tan bajas como 10 moléculas/ensayo (mol/ensayo) usando los conjuntos de cebador/sonda 1, 2 y 3 para VIH-1, y la detección de 100 moléculas/ensayo usando el conjunto de cebador/sonda 4 para VIH-1.

TABLA 3

mol de [VIH-1]/ensayo	Conjunto n° 1 proporción de LCx®	Conjunto n° 2 proporción de LCx®	Conjunto n° 3 Proporción de LCx®	Conjunto n° 4 Proporción de LCx®
10.000	2485,4	1389,6	1179,6	1459,3
1000	2323,8	1370,4	1061,1	892,6
100	1452,7	1358,2	605,2	211,9
10	490,0	835,3	440,6	73,8
0	33,0	18,7	48,1	59,7

50 Ejemplo 3

Sensibilidad de la detección de VIH-2

55 Para evaluar la sensibilidad de los diferentes conjuntos consenso de cebador/sonda para VIH-2 se usó VIH-2 del subtipo A. Se aisló ARN a partir de viriones de subtipo A de VIH-2 purificado por gradiente (VIH-2_{NIH2}, Advanced Biotechnologies Inc., Columbia, MD) usando el procedimiento de extracción de ARN de Qiagen y la metodología de columna descrita por el fabricante (Qiagen, Frankfurt, Germany). Se purificó ARN a partir de viriones que inicialmente se cuantificaron por microscopía electrónica. El ARN purificado resultante se diluyó en ARN ribosomal a 1 ng/ μl hasta niveles apropiados para la detección.

60 Se evaluaron tres conjuntos consenso de cebador/sonda diferentes para VIH-2: el conjunto n° 5 usó las SEC ID N° 16 y 17 como cebadores y la SEC ID N° 18 como sonda, el conjunto n° 6 usó las SEC ID N° 19 y 20 como cebadores y la SEC ID N° 22 como sonda (aunque también podría haberse empleado la SEC ID N° 21 como sonda en solitario o en combinación con la SEC ID N° 22) y el conjunto n° 7 usó las SEC ID N° 20 y 23 como cebadores y la SEC ID N° 21 como sonda. Todas las secuencias se prepararon como se describe en el Ejemplo 1.

ES 2 324 125 T3

Las mezclas de reacción se prepararon, se sometieron a transcripción inversa, se amplificaron y se detectaron usando los tres conjuntos consenso de cebador/sonda para VIH-2 en reacciones separadas, como se describe en el Ejemplo 2.

- 5 Los resultados presentados en la Tabla 4 muestran la detección de VIH-2 hasta concentraciones tan bajas como 1 molécula/ensayo usando los conjuntos consenso de cebador/sonda 5 y 6 para VIH-2 y, la detección de 100 moléculas/ensayo usando el conjunto de cebador/sonda 7 para VIH-2.

TABLA 4

mol de [VIH-2]/ensayo	Conjunto nº 5 proporción de LCx®	Conjunto nº 6 Proporción de LCx®	Conjunto nº 7 Proporción de LCx®
10.000	2254,3	1427,3	501,1
1000	2310,5	1309,6	541,2
100	2290,6	1084,9	343,6
10	1967,5	750,3	75,1
1	1116,9	371,4	49,0
0	28,4	78,6	48,1

30 Ejemplo 4

Detección de subtipos de VIH-1

- 35 La divergencia genética del VIH es el aspecto más desafiante de la detección. Existe la necesidad de ensayos que detecten de forma precisa todos los subtipos, incluyendo el subtipo más divergente "O". Se obtuvieron muestras de suero de Digene (Silver Spring, MD) de los subtipos A-F de VIH-1, y dos aislados de VIH-1 del subtipo O. Se extrajo y purificó ARN viral de cada uno de los aislados usando columnas Qiagen y la metodología descrita por el fabricante (Qiagen, Frankfurt, Germany). Se cuantificó el ARN en copias de ARN viral por mililitro y se realizaron 10 diluciones en serie en ARN ribosomal a 1 ng/ μ l para la detección. La Tabla 5 muestra la cantidad de ARN (moléculas/ensayo) 40 usado por reacción a cada dilución de muestra para cada subtipo.

TABLA 5

	moléculas de ARN/ensayo				
	Dilución de muestra				
	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵
Subtipo de VIH-1					
A	1737	173	17,3	1,73	0,17
B	890	89	8,9	0,89	0,09
C	247	24,7	2,47	0,25	0,03
D	20.700	2070	207	20,7	2,07
E	7170	717	71,7	7,17	0,72
F	24.000	2400	240	24	2,4
HAM O	66.460	6646	664,6	66,46	6,65
LA O	149.000	14.900	1490	149	14,9

ES 2 324 125 T3

Los cuatro conjuntos consenso de cebador/sonda diferentes para VIH-1 se usaron en reacciones separadas para transcribir de forma inversa, amplificar y detectar el ARN de la muestra de los distintos subtipos de VIH-1 como se describe en el Ejemplo 2. El subtipo O se ensayó sólo con el conjunto nº 1 de cebador/sonda para VIH-1. Las Tablas 6 a 9 mostradas a continuación muestran los resultados de este examen.

TABLA 6

	Conjunto nº 1 de VIH-1, proporción de LCx® (c/s/s)				
	Dilución de muestra				
Subtipo de VIH-1	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵
A	1995	1530	559	45	37
B	2103	1979	750	31	27
C	740	135	133	26	24
D	1988	2042	1907	1226	528
E	2040	1954	1584	661	71
F	2027	1967	1871	1116	461
HAM O	1315	1389	1507	1224	168
LA O	1206	1413	1509	1403	650

El conjunto nº 1 de cebador/sonda para VIH-1 detectó todos los subtipos de VIH-1 ensayados en la Tabla 6 anterior, incluyendo la amplia divergencia de los subtipos O, en un intervalo de sensibilidad entre 100 y 1 molécula/ensayo.

TABLA 7

	Conjunto nº 2 de VIH-1, proporción de LCx® (c/s/s)				
	Dilución de muestra				
Subtipo de VIH-1	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵
A	1218	1207	791	165	34
B	1597	1873	1544	380	20
C	569	300	*	*	*
D	1864	1866	1796	1246	636
E	931	949	856	406	61
F	1872	1838	1882	1807	1063

El conjunto de cebador/sonda nº 2 detectó todos los subtipos de VIH-1 ensayados en la Tabla 7 anterior con una sensibilidad similar a la del conjunto de cebador/sonda nº 1.

ES 2 324 125 T3

TABLA 8

Conjunto nº 3 de VIH-1					
Dilución de muestra					
Subtipo de VIH-1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
A	+	+	-	-	-
B	+	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-
D	ND	+	+/-	-	-
E	+	+	-	-	-
F	ND	+	+	+	-
(ND = no determinado)					

El conjunto de cebador/sonda nº 3 detectó 5 de los 6 subtipos de VIH-1 ensayados en la Tabla 8 anterior con una sensibilidad de aproximadamente 200 moléculas/ensayo.

TABLA 9

Conjunto nº 4 de VIH-1					
Dilución de muestra					
Subtipo de VIH-1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
A	-	-	-	-	-
B	+	-	-	-	-
C	-	-	-	-	ND
D	+	+	+	-	-
E	+	+	+/-	-	-
F	+	-	-	-	-
(ND = no determinado)					

El conjunto de cebador/sonda nº 4 detectó 4 de los 6 subtipos de VIH-1 ensayados en la Tabla 9 anterior con una sensibilidad de entre 2000 y 200 mol/ensayo.

Ejemplo 5

specificidad de los conjuntos de cebador/sonda para VIH-1 y VIH-2

Se evaluó la especificidad de los conjuntos nº 1 y nº 2 de cebador/sonda para VIH-1 frente a ARN extraído y purificado a partir de VIH-1 de subtipo B (cepas MN y 3B) y muestras de suero de VIH-2 como en el Ejemplo 4. Los dos conjuntos consenso de cebador/sonda de VIH-1 diferentes se usaron en reacciones separadas para transcribir de forma inversa, amplificar y detectar diluciones 1:10 del ARN de la muestra como se describe en el Ejemplo 2. Como se muestra en la Tabla 10, ambos conjuntos de cebador/sonda para VIH-1 detectan los dos ARN de VIH-1, pero no detectan ARN de suero de VIH-2, indicando que los conjuntos de cebador/sonda para VIH-1 son específicos para detectar VIH-1 y no reaccionan de forma cruzada y detectan VIH-2.

ES 2 324 125 T3

TABLA 10

ARN de muestra	Conjunto nº 1 de VIH-1, proporción de LCx®	Conjunto nº 2 de VIH-1, proporción de LCx®
VIH-1 _{MN}	2317	1321
VIH-1 _{3B}	2366	1395
VIH-2	109	19

A continuación, se examinó la especificidad del conjunto nº 5 de cebador/sonda para VIH-2 frente a ARN aislado a partir de VIH-1 purificado en gradiente como en el Ejemplo 2. Las diluciones del ARN de VIH-1 purificado se sometieron a transcripción inversa, se amplificaron por PCR y se detectaron como en el Ejemplo 2 usando el conjunto nº 5 de cebador/sonda consenso de VIH-2, usándose el conjunto nº 1 de cebador/sonda consenso de VIH-1 en reacciones separadas como control. Los resultados, mostrados en la Tabla 11, indican que el conjunto nº 5 de cebador/sonda consenso de VIH-2 no reacciona de manera cruzada con el ARN de VIH-1 ni lo detecta.

TABLA 11

mol de [VIH-1]/ensayo	Conjunto nº 1, proporción de LCx®	Conjunto nº 5, proporción de LCx®
1.000.000	1792	16
100.000	1819	15
10.000	1812	16
1000	1823	15
100	1714	15
10	517	15
0	27	16

Ejemplo 6

Detección de VIH-1 y VIH-2 con cebadores/sondas para VIH-1 y VIH-2

Para permitir el ensayo de VIH-1 y VIH-2 en una sola reacción en vez de en dos reacciones separadas, tendrían que usarse conjuntos de cebador/sonda para VIH-1 y para VIH-2 en la misma reacción. La posibilidad de hacer esto se ensayó mezclando conjuntos de cebador/sonda para VIH-1 y para VIH-2 y usándolos para detectar ARN purificado de VIH-1 o de VIH-2.

Se purificaron ARN de VIH-1 y 2 y se cuantificaron como en los Ejemplos 2 y 3 respectivamente. El conjunto de cebador/sonda nº 1 para VIH-1 y el conjunto de cebador/sonda nº 8 para VIH-2, que consistían en las SEC ID N° 16 y 24 como cebadores y en las SEC ID N° 18 como sondas, preparados como se describe en el Ejemplo 1, se usaron juntos o separados para la transcripción inversa, la amplificación y la detección de las diluciones de ARN purificado de VIH-1 y de VIH-2 como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

TABLA 12

mol de [VIH-1]/ensayo	VIH-1, proporción de LCx®	VIH-1/2 proporción de LCx®	mol de [VIH-2]/ensayo	VIH-2, proporción de LCx®	VIH-1/2, proporción de LCx®
10.000	2144,5	1858,3	10.000	2094,1	2261,6
1000	1708,0	1550,2	1000	2209,2	1966,8
100	680,8	539,6	100	2216,2	1066,6
10	112,6	151,0	10	1879,8	254,9
1	ND	ND	1	805	66,8
0	50,4	74,5	0	31	90,4
(ND = no determinado)					

Aunque hubo una disminución logarítmica de 1 a 1,5 en la detección de VIH-2 cuando se usaron los conjuntos de cebador/sonda para VIH-1 y para VIH-2 en la misma mezcla de reacción, la sensibilidad se mantuvo aceptable a aproximadamente 10 moléculas por reacción. De manera importante, la detección de VIH-1 no se alteró por la inclusión del conjunto de cebador/sonda para VIH-2 junto con el conjunto de cebador/sonda para VIH-1 en las mezclas de reacción de VIH-1, manteniéndose la sensibilidad a aproximadamente 10 moléculas por reacción.

REIVINDICACIONES

1. Conjunto de cebador/sonda 1 (SEC ID N° 2, 3 y 4) para detectar VIH-1.

2. Un método para detectar VIH en una muestra, comprendiendo dicho método los pasos de:

(a) formar una mezcla de reacción que comprende reactivos de amplificación de ácidos nucleicos, conjunto 1 de cebador/sonda (SEC ID N° 2, 3 y 4), y una muestra de ensayo que contiene una secuencia diana de VIH;

(b) someter la mezcla a condiciones de amplificación para generar al menos una copia de una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana;

(c) hibridar la sonda con la secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana, para formar así un híbrido que comprenda la sonda y la secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia diana; y

(d) detectar el híbrido como una indicación de la presencia de VIH en la muestra de ensayo.

3. El método de la reivindicación 2, en el que dichos reactivos de amplificación incluyen una enzima que tiene actividad transcriptasa inversa y dicho método comprende además el paso, después del paso (a) y antes del paso (b), de formar un ADNc a partir de un genoma de VIH.

4. En el método de la reivindicación 2, en el que el paso (b) se repite entre 10 y 100 veces.

5. Un kit que comprende:

conjunto 1 de cebador/sonda (SEC ID N° 2, 3 y 4); y

reactivos de amplificación.

6. El kit de la reivindicación 5 en el que los reactivos de amplificación comprenden una enzima que posee actividad transcriptasa inversa.

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5 (i) SOLICITANTE: P. Kroeger
K. Abravaya
J. Gorzowski
R. Hoenle
C. Esping
10 J. Moore
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA DETECTAR VIH-1 Y VIH-2
- 15 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 23
- (iv) DIRECCIÓN POSTAL:
- (A) DIRECCIÓN: Abbott Laboratories
20 (B) CALLE: 100 Abbott Park Road
(C) CIUDAD: Abbott Park
(D) ESTADO: Illinois
(D) PAÍS: Estados Unidos
25 (E) CÓDIGO POSTAL: 60064-3500
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR
- (A) TIPO DE SOPORTE: Disquete
30 (B) ORDENADOR: MacIntosh
(C) SISTEMA OPERATIVO: System 7.0.1
(D) SOFTWARE: Microsoft Word 5.1a
- 35 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
40 (C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DEL MANDATARIO/AGENTE
- (A) NOMBRE: Paul D. Yasger
45 (B) NÚMERO DE REGISTRO: 37.477
(C) NÚMERO DE EXPEDIENTE: 6127.US.01
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES
- (A) TELÉFONO: 847/938-3508
50 (B) TELEFAX: 847/938-2623
(C) TELEX.

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 1

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 2348 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
60 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN genómico (VIH-1)
65

ES 2 324 125 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 1

	ACAGTATTAG	TAGGACCTAC	ACCTGTCAAC	ATAATTGGAA	GAAATCTGTT	50
	GACTCAGCTT	GGGTGCACCT	TAAATTTTCC	CATTAGTCCT	ATTGAAACTG	100
5	TACCAGTAAA	ATTAAAGCCA	GGAATGGATG	GCCCCAAAGT	TAAACAATGG	150
	CCATTGACAG	AAGAAAAAAT	AAAAGCATT	ATAGAAATTT	GTACAGAAAT	200
	GGAAAAGGAA	GGGAAAATTT	CAAAAATTGG	GCCTGAAAAT	CCATACAATA	250
	CTCCAGTATT	TGCCATAAAG	AAAAAAGACA	GTACTAAATG	GAGAAAAATTA	300
	GTAGATTTCA	GAGAACTTAA	TAAGAAAAC	CAAGACTTCT	GGGAGTTTCA	350
10	ATTAAGGAATA	CCACATCCTG	CAGGGTTAAA	AAAGAAAAAA	TCAGTAACAG	400
	TACTGGATGT	GGGTGATGCA	TATTTTTCAG	TTCCCTTAGA	TAAAGACTTC	450
	AGGAAGTATA	CTGCATTTAC	CATACCTAGT	ATAAACAATG	AAACACCAGG	500
	GATTAGATAT	CAGTACAATG	TGCTTCCACA	GGGATGGAAA	GGATCACCAG	550
	CAATATTCCA	AAGTAGCATG	ACAAAAATCT	TAGAGCCTTT	TAGAAAACAA	600
15	AATCCAGACA	TAGTTATCTA	TCAATACATG	GATGATTGTT	ATGTAGGATC	650
	TGACTTAGAA	ATAGGGCAGC	ATAGAGCAAA	AATAGAGGAA	CTGAGACGAC	700
	ATCTGTTGAG	GTGGGGATTT	ACCACACCAG	ACAAAAAACA	TCAGAAAGAA	750
	CCTCCATTCC	TTTGGATGGG	TTATGAACTC	CATCCTGATA	AATGGACAGT	800
	ACAGCCTATA	GTCTACCAG	AAAAAGACAG	CTGGACTGTC	AATGACATAC	850
20	AGAAGTTAGT	GGGAAAATTG	AATTGGGCAA	GTCAGATTTA	CGCAGGGATT	900
	AAAGTAAAGC	AATTATGTAA	ACTCCTTAGA	GGAACCAAAG	CACTAACAGA	950
	AGTAATACCA	CTAACAGAAG	AAGCAGAGCT	AGAACTGGCA	GAAAACAGGG	1000
	AAATTCTAAA	AGAACCAGTA	CATGGAGTGT	ATTATGACCC	ATCAAAAGAC	1050
	TTAATAGCAG	AAGTACAGAA	GCAGGGGCAA	GGCCAATGGA	CATATCAAAT	1100
25	TTATCAAGAG	CCATTTAAAA	ATCTGAAAAC	AGGCAAAAT	GCAAGAATGA	1150
	GGGGTGCCCA	CACTAATGAT	GTAAAACAAT	TAACAGAGGC	AGTGCAAAAA	1200
	ATAGCCACAG	AAAGCATAGT	AATATGGGGA	AAGACTCCTA	AATTTAGACT	1250
	ACCCATACAA	AAAGAAACAT	GGGAAACATG	GTGGACAGAG	TATACOTAAG	1300
	CCACCTGGAT	TCCTGAGTGG	GAGGTTGTCA	ATACCCCTCC	CTTAGTGAAA	1350
30	TTATGGTACC	AGTTAGAGAA	AGAACCCATA	GTAGGTGCAG	AACTTTTCTA	1400
	TGTAGATGGG	GCAGCTAACA	GGGAGACTAA	AAAAGGAAAA	GCAGGATATG	1450
	TTACTAACAG	AGGAAGACAA	AAGGTTGTCT	CCCTAACTGA	CACAACAAAT	1500
	CAGAAGACTG	AGTTACAAGC	AATTCATCTA	GCTTTGCAAG	ATTCAGGGTT	1550
	AGAAGTAAAC	ATAGTAACAG	ACTCACAAATA	TGCATTAGGA	ATCATTCAAG	1600
35	CACAACCAGA	TAAAAGTGAA	TCAGAGTTAG	TCAGTCAAAT	AATAGAGCAG	1650
	TTAATAAAAA	AGGAAAAGGT	CTATCTGGCA	TGGGTACCAG	CACACAAAGG	1700
	AATTGGAGGA	AATGAACAAG	TAGATAAATT	AGTCAGTGCT	GGAATCAGGA	1750
	AAGTACTATT	TTTAGATCGA	ATAGATAAGG	CCCAGAAGA	CCATGACAAA	1800
40	TATCACAGTA	ATTGGAGAGC	AATGGCTAGT	GACTTTAACC	TACCACCTAT	1850
	AGTAGCAAAA	GAAATAGTAG	CCAGCTGTGA	TAAATGTCAG	CTAAAAGGAG	1900
	AAGCCATGCA	TGGACAAGTA	GACTGTAGTC	CAGGAATATG	GCAACTAGAT	1950
	TGTACACATT	TAGAAGGAAA	AGTTATCCTG	GTAGCAGTTC	ATGTAGCCAG	2000
	TGGATACATA	GAAGCAGAAG	TTATTCCAGC	AGAGACAGGG	CAGGAGACAG	2050
45	CATACTTTCT	CTTAAAATTA	GCAGGAAGAT	GGCCAGTAAA	AACAATACAT	2100
	ACAGACAATG	GCCCCAATTT	CACCACTACT	ACGGTTAAGG	CCGCTGTTG	2150
	GTGGACGGGA	ATCAAGCAGG	AATTTGGCAT	TCCCTACAAT	CCCCAAAGTC	2200
	AAGGAGTAAT	AGAATCTATG	AATAAAGAAT	TAAAGAAAAAT	TATAGGACAG	2250
	GTAAGAGATC	AGGCTGAACA	TCTTAAGAGA	GCAGTACAAA	TGGCAGTATT	2300
50	CATCCACAAT	TTTAAAAGAA	AAGGGGGGAT	TGGGGGGTAC	AGTGCAGG	2348

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 2

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 29 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- 60 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 2:

65 ATCCCTACA ATCCCCAAAG TCAAGGAGT

ES 2 324 125 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 22 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- 10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 3:

15 CCTGCACTGT ACCCCCCAAT CC 22

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 4

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 25 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 4:

30 ACAGCAGTAC AAATGGCA 18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 26 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 40 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 5:

45 GGAGCAGAAA CTTTCTATGT AGATGG 26

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 29 pares de bases
- 55 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 6:

60 CATATTGTGA GTCTGTTACT ATGTTTACT 29

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 7

ES 2 324 125 T3

5	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 18 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE CADENA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal	
10	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 7: TAGGAAAAGC AGGATATG	18
15	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 8 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 29 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE CADENA: doble (D) TOPOLOGÍA: lineal	
20	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 8: GGTACAGTAT TAGTAGGACC TACACCTGT	29
30	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 9: (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 28 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE CADENA: doble (D) TOPOLOGÍA: lineal	
35	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 9: GGCCATTGTT TAACTTTTGG GCCATCCA	28
40	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 10: (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 20 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE CADENA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal	
45	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 10: ATTAGTCCTA TTGAAACTGT	20
50	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 11 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
55	(A) LONGITUD: 20 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE CADENA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal	
60	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 10:	
65	ATTAGTCCTA TTGAAACTGT	20

ES 2 324 125 T3

5	(A) LONGITUD: 15 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE CADENA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético	
10	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 11:	
	ATAAGCCCCA TAGCC	15
15	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 12	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 26 pares de bases	
20	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE CADENA: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético	
25	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 12:	
	CCTAGTATAA ACAATGAGAC ACCAGG	26
30	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 13:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 26 pares de bases	
35	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE CADENA: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
40	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 13:	
45	GATCCTACAT ACAAGTCATC CATGTA	26
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 14:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
50	(A) LONGITUD: 18 pares de bases	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE CADENA: sencilla	
55	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 14:	
60	GGATGGAAAG GATCACCA	18
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 15:	
65	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 2689 pares de bases	

ES 2 324 125 T3

- (B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN genómico (VIH-2)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 15:

10	TTGCTGCACC	TCAATTCTCT	CTTTGGAAAA	GACCAGTAGT	CACAGCACAC	50
	ATTGAGGGTC	AGCCAGTAGA	AGTTTTGTTA	GACACAAGGG	CTAACGACTC	100
	AATAGTAGCA	GGAATAGACT	TAGGGAGCAA	TTATAGTCCA	AAAATAGTAG	150
	GAGGAATAGG	GGGATTCATA	AATACCAAGG	AATATAAAAA	TGTAGAAATA	200
15	GAAGTCCTAG	GTAAAAGGGT	AAAAGCCACC	ATAATGACAG	GTGATACCCC	250
	GATCAACATT	TTTGGCAGAA	ATGTTCTGAC	AGCTTTAGGC	ATGTCATTAA	300
	ACCTGCCAGT	TGCCAAGATA	GAACCAATAA	AAATAATGCT	AAAGCCAGGG	350
	AAAGATGAC	CAAGACTAAA	ACAATGGCCT	TTAACAAAAG	AAAAAATAGA	400
	AGCACTAAAA	GAAAATCTGT	AAAAAATGGA	AAAAGAAGGC	CAGCTAGAAG	450
20	AAGCACCCTC	AACTAATCCT	TATAATACCC	CCACATTTGC	AATCAAGAAA	500
	AAGGACAAAA	ACAAATGGAG	AATGCTAATA	CACTTTAGGG	AGCTAAACAA	550
	GGTAACTCAG	GATTTTCACAG	AAATTCAGTT	AGGAATTCCA	CACCCAGCAG	600
	GATTGGCCAA	AAAGAGGAGA	ATTACTGTAC	TAGATGTAGG	GGATGCTTAC	650
	TTTTCCATAC	CACTACATGA	GGACTTTAGA	CAGTATACTG	CATTCACTCT	700
25	ACCATCAGTA	AACAATGCAG	AACCAGGAAA	AAGATATATA	TACAAAGTCC	750
	TACCACAGGG	GTGGAAGGGG	TCACCAGCAA	TTTTTCAATA	CACAATGAGG	800
	CAGATCTTAG	AACCATTTCAG	AAAAGCAAAAC	GAGGATGTCA	TTATCATTCA	850
	GTACATGGAT	GATATCTTAA	TAGCCAGCGA	CAGGACAGAC	TTAGAACATG	900
	ACAAAGTGGT	CCTGCAGCTA	AAAGAACTTC	TAAATGGACT	AGGATTTTCC	950
30	ACCCCAGATG	AGAAATTCCA	GAAAGACCCT	CCATATCGCT	GGATGGGCTA	1000
	TGAATTATGG	CCAACTAAAT	GGAAGTTGCA	AAAAATACAG	CTGCCCCAAA	1050
	AAGAAGTATG	GACAGTCAAT	GACATCCAAA	AGCTAGTGGG	TGTCTTAAAT	1100
	TGGGCAGCAC	AAATCTACCC	AGGGATAAAG	ACCAAACACC	TATGTAGGCT	1150
	AATTAGAGGA	AAAATGCAC	TCACAGAAGA	GGTACAGTGG	ACAGAATTAG	1200
35	CAGAAGCAGA	GCTAGAGGAA	AACAGAATTA	TCTTAAGCCA	GAAACAAGAA	1250
	GGACACTATT	ACCAGGAAGA	AAAAAAGTTA	GAAGCAACAG	TCCAGAAAGA	1300
	TCAAGACAAT	CAGTGGACAT	ATAAGGTACA	CCAGGGGGAG	AAAATTCTCA	1350
	AAGGTGGGAA	AATATGCAAA	GATAAAAAAT	ACCCATACCA	ACGGGTCAGA	1400
	TTGTTAGCAC	AGGTAGTTCA	AAAAATAGGA	AAAGAAGCAC	TAGTCATTTG	1450
40	GGGACGGATA	CCAAAATTTC	ACCTACCAGT	AGAGAGAGAT	ACCTGGGAGC	1500
	AGTATCTGGG	TAATCTACTG	CAAGTAACAT	GGATCCCAGA	CTGGGACTTT	1550
	GTATCTACCC	CACCACCTGGT	CAGGCTAGCA	TTTAACCTGG	TAGGAGAGCC	1600
	TGTACCAGGC	GCAGAAACTT	TCTACACAGA	TGGATCCTGC	AATAGGCACT	1650
	CAAAAGAAGG	GAAAGCAGGA	TATATAACAG	ATAGAGGGAG	AGACAGGGTA	1700
45	AAAGTATTAG	AGCAAACCTAC	CAATCAGCAA	GCAGAATTAG	AAGCCTTTGC	1750
	AATGGCACTA	ACAGACTCAG	GTCCAAAAGC	TAATATTATA	GTAGACTCAC	1800
	AATATGTAAT	GGGGATAGTA	GCAGGCCAAC	CAACAGAGTC	AGAGAATAGA	1850
	ATAGTAAATC	AGATCATAGA	AGAAATGATA	AAGAAAGAAG	CAATCTATGT	1900
	TGCGTGGGTC	CCAGCCCACA	AAGGCATAGG	AGGAAACCAG	GAAGTAGATC	1950
50	ATTTAGTAAG	TCAGGGCATT	AGACAAGTAT	TATTCCTAGA	GAAAATAGAA	2000
	CCCGCGCAGG	AAGAACATGA	AAAATATCAT	AGCAATATAA	AAGAACTGTC	2050
	CCATAAATTT	GGAATACCCA	AGCTAGTGGC	AAGACAAATA	GTAACACAT	2100
	GTGCCCATGT	GCAACAGAAA	GGGGAGGGCTA	TACATGGGCA	AGTAAATGCA	2150
	GAACTAGGCA	CTTGGCAAAT	GGACTGCACA	CATTTAGAAG	GAAAAGTCAT	2200
55	TATAGTAGCA	GTACATGTTG	CAAGTGGATT	TATAGAGGCA	GAAGTTATCC	2250
	CACAGGAATC	AGGAAGGCAA	ACAGCACTGT	TCTTACTGAA	ACTGGCCAGT	2300
	AGGTGGCCAA	TAACACACCT	GCACACAGAT	AATGGTGCCA	ACTTCACTTC	2350
	ACAGGAAGTG	AAAAATGGTAG	CATGGTGGGT	AGGTATAGAA	CAAACCTTTG	2400
	GAGTGCCTTA	CAATCCACAA	AGCCAAGGAG	TAGTAGAAGC	AATGAATCAT	2450
60	CATCTAAAAA	ATCAGATAGA	CAGAATTAGA	GACGAGGCAA	ATACAGTAGA	2500
	AACAATAGTA	TTAATGGCAG	TTCATTGCAT	GAATTTTAAA	AGAAGGGGAG	2550
	GAATAGGGGA	TATGACCCCA	GCAGAAAGAA	TAATCAATAT	GATCACCACA	2600
	GAACAAGAAA	TACAATTCTT	CCAAGCAAAA	AATTCAAAAT	TAAAAAATTT	2650
65	TCGGGTCTAT	TTCAGAGAAG	GCAGAGATCA	GCTGTGGAA		2689

ES 2 324 125 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 16:

ACTGATGGCA GTTCATTGCA TGAATTTTAA AAG

33

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 17:

TTCCACAGCT GATCTCTGCC TTCTCTG

27

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 18:

CAGAACAAGA AATACAATTC

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 19:

CCTCAATTCT CTCTTTGGAA AAGACC

26

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 20:

ES 2 324 125 T3

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 26 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: doble
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 20:
- AAATGTTGAT TGGGGTATCT CCTGTC 26
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 21:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 17 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 21:
- CCAAAAATAG TAGGGGG 17
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 22:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 17 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 22:
- ATAGTAGCAG GAATAGA 17
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 23:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 25 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 23:
- CAATAGTAGC AGGAATAGAG TTAGG 25
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 24:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 324 125 T3

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 24:

CACAGCTGAT CTCTGCCTTC TCTGTAATAG AC

32