



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 332 712**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03293185 .9**

96 Fecha de presentación : **16.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1544311**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2005**

54 Título: **Oligonucleótidos para la detección del virus de la hepatitis B.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.02.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.02.2010

73 Titular/es: **Bio-Rad Pasteur
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette, FR**

72 Inventor/es: **Biron, Marie-Philippe**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 332 712 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 para la detección del virus de la hepatitis B.

5 La presente invención se refiere a cebadores de oligonucleótidos y a sondas para una detección rápida y sensible del virus de la hepatitis B, mediante amplificación, y a métodos que emplean los mismos.

El virus de la hepatitis B (VHB) es un miembro de la familia *Hepadnaviridae*. Estos son virus de ADN bicatenario que se replican inusualmente, mediante transcripción inversa. Se ha descrito una variedad de variantes de este virus. El VHB es el principal agente causal de la hepatitis crónica y está implicado en la cirrosis hepática y en el carcinoma hepatocelular. El virus de la hepatitis B es endémico en la población humana e hiperendémico en muchas partes del mundo. Se estima que más de un tercio de la población mundial ha estado infectada con el virus de la hepatitis B. Aproximadamente el 5% de la población, son portadores crónicos del VHB y cerca del 25% de todos los portadores, desarrollan enfermedades hepáticas graves tales como hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular primario. La infección con VHB causa más de un millón de muertes cada año.

Las respuestas inmunes mediadas con anticuerpos y por células, frente a varios tipos de antígenos, se inducen durante la infección. La respuesta inmune frente a una infección con el virus de la hepatitis B, se dirige por lo menos hacia tres antígenos: el antígeno de la superficie de la hepatitis B, el antígeno del núcleo (HBcAg) y el antígeno e (HBeAg). El antígeno de la superficie aparece en el suero de la mayoría de los pacientes durante el estado tardío del periodo de incubación, es decir, 2-8 semanas después de la infección, y persiste durante la enfermedad aguda y disminuye bruscamente cuando se vuelve detectable el anticuerpo contra el antígeno de la superficie. La IgM para el antígeno del núcleo se encuentra en el suero, de 2-10 semanas después de que aparezca el antígeno de superficie. Se correlaciona con la cantidad y la duración de la replicación vírica. Como el antígeno e de la hepatitis B, es secretado por hepatocitos infectados, pero en casi todos los individuos se observa, eventualmente, una seroconversión de HBeAg a anti-HBe, asociada con el aclaramiento de los hepatocitos infectados.

Los inmunoensayos se han desarrollado para detectar y medir los antígenos y los anticuerpos del VHB.

30 Sin embargo tales inmunoensayos pueden generar falsos resultados negativos. Además, cuando se lleva a cabo un método inmunológico dentro de la fase de seroconversión del individuo, la infección con VHB puede quedar sin detectar ya que no se encontraría ningún antígeno o anticuerpo circulante. Por tanto, los métodos de diagnóstico que dependen de la detección de ácido nucleico de VHB, proporcionan un método más preciso que permite una detección más temprana del virus.

35 El documento de patente de EE.UU. nº 2003/0157478 describe un método y un equipo de reactivos para diagnosticar VHB mediante PCR y la hibridación con una sonda para la detección.

Algunos equipos de reactivos para diagnóstico se han comercializado en este campo, por ejemplo, Amplicor HBV Monitor y Cobas Amplicor HBV Monitor (Roche Molecular Systems), Versant HBV DNA (bADN, Bayer Diagnostics) y el ensayo de ADN de Digene Hybrid-Capture 2 HBV (Digene Corporation). Sin embargo, estos ensayos tienen generalmente un campo de cuantificación limitado, con no más de 4 log: 10^3 hasta $4 \cdot 10^6$ copias/ml para Amplicor HBV Roche ($2 \cdot 10^2$ hasta $2 \cdot 10^5$ copias/ml para Cobas HBV Roche), $7 \cdot 10^5$ hasta $5 \cdot 10^9$ copias/ml para Versant HBV Bayer y $7 \cdot 10^5$ hasta $5,6 \cdot 10^9$ copias/ml para Digene HBV DNA ($4,7 \cdot 10^3$ hasta $5,7 \cdot 10^7$ copias/ml para Ultrasensitive Digene HBV DNA). Por tanto, el inconveniente principal de todos estos ensayos reside en el hecho de que ninguno de ellos hace posible una cuantificación clara y sencilla del VHB desde concentraciones muy bajas hasta muy altas. Por lo tanto, todavía es necesario frecuentemente combinar al menos dos ensayos para poder obtener un resultado fiable, particularmente en caso de tener un nivel de concentración vírica alto o bajo.

50 Por ello, existe una necesidad de una cuantificación fiable del VHB en un grado extenso, cualquiera que sea la concentración del virus en una muestra y sin la necesidad de realizar ningún ensayo adicional.

Además, todavía existe la necesidad de un ensayo cuantitativo sensible que detecte específicamente todos los genotipos de VHB conocidos en la técnica.

55 En este contexto, los inventores han diseñado cebadores y sondas que proporcionan unos medios particularmente rápidos y sensibles para detectar el ácido nucleico de VHB, procedente de genotipos A hasta G con un amplio grado de cuantificación.

60 **Definiciones**

De acuerdo con la presente invención, se puede emplear cualquier técnica convencional de biología molecular, microbiología y de ADN recombinante dentro del estado de la técnica. Tales técnicas se explican con detalle en la bibliografía. Véase, p. ej., Sambrook y col., 1989; "DNA Cloning: A Practical Approach". Volúmenes I y II (compilador D. N. Glover, 1985); "Oligonucleotide Synthesis" (compilador M. J. Gait, 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [compiladores B. D. Hames & S. J. Higgins (1985)]; "Transcription and Translation" [compiladores B. D. Hames & S. J. Higgins (1984)]; "Animal Cell Culture" [compilador R. I. Freshney, (1986)]; "Immobilized Cells and Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, 1984; F. M. Ausubel y col. (compiladores), 1994.

Una “molécula de ácido nucleico” se refiere a cualquier ácido nucleico: puede ser sintético o no, recombinante o estar presente en la naturaleza, ser lineal o circular. Puede estar en forma monocatenaria o bicatenaria. Estas moléculas de ácido nucleico incluyen ADN genómico, ADNc o ARN. A no ser que se especifique de otro modo, las secuencias se describen según la convención normal de dar las secuencias sólo en la dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra de ADN no transcrita (es decir, la hebra que tiene una secuencia homóloga a la del ARNm).

Tal y como se emplea en esta memoria, el término “*oligonucleótido*” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se puede emplear como cebador en un procedimiento de amplificación o como sonda en un método de detección. En el contexto de la invención, estos oligonucleótidos consisten en al menos 10, preferentemente al menos 15, y más preferentemente al menos 20 nucleótidos, preferentemente no más de 100 nucleótidos, más preferentemente no más de 40 nucleótidos que sean hibridables con una molécula de ADN genómico, una molécula de ADNc o una molécula de ARNm que codifica un gen, un ARNm, un ADNc u otro ácido nucleico de interés.

Una molécula de ácido nucleico es “*hibridable*” con otra molécula de ácido nucleico, tal como un ADNc, un ADN genómico o un ARN, cuando una forma con cadena sencilla de la molécula de ácido nucleico se puede reasociar con la otra molécula de ácido nucleico, bajo unas condiciones adecuadas de temperatura y de fuerza iónica de la solución (véase, Sambrook y col., 1989). Las condiciones de temperatura y de fuerza iónica determinan las “*condiciones rigurosas*” de la hibridación. Las condiciones rigurosas para hibridar ácidos nucleicos dependen de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementación, variables bien conocidas en la técnica. Cuanto mayor sea el grado de similitud o de homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor será el valor de T_m para los híbridos de ácidos nucleicos que tienen esas secuencias. La estabilidad relativa (que se corresponde con una T_m superior) de las hibridaciones de ácido nucleico, disminuye en el siguiente orden: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Para híbridos con más de 100 nucleótidos de longitud, se han obtenido ecuaciones para calcular la T_m (véase Sambrook y col., 1989, 9.50-9.51). Para hibridar ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleótidos, la posición de los desemparejamientos se vuelve más importante y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook y col., 1989, 11.7-11.8). Una longitud mínima para un ácido nucleico hibridable es al menos aproximadamente 10 nucleótidos, preferentemente al menos aproximadamente 15 nucleótidos y más preferentemente la longitud es al menos aproximadamente 20 nucleótidos.

La PCR se realiza bajo condiciones muy rigurosas, empleando una temperatura de reasociación de al menos 50°C, en un tampón con fuerza iónica elevada. De acuerdo con una realización preferida de la invención, la temperatura escogida para la etapa de reasociación está en el intervalo desde 55°C hasta 60°C y la fuerza iónica se obtiene empleando una combinación de KCl y MgCl₂ que favorece una tasa alta de unión específica de oligonucleótidos frente a la inespecífica durante la etapa de reasociación de cada ciclo de la PCR. Esto permite unas condiciones rigurosas de reasociación del cebador, que conducen a una especificidad incrementada de la PCR. Por ejemplo, una combinación de KCl 50 mM y MgCl₂ 6 mM puede ser adecuada para conferir una especificidad alta. Sin embargo, se pueden emplear otras condiciones de fuerza iónica y pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica.

“*Amplificación*” del ADN, tal y como se emplea en esta memoria, significa el incremento de la concentración de una secuencia particular de ADN, dentro de una mezcla de secuencias de ADN. La etapa de amplificación se puede realizar según cualquier método, empleando métodos convencionales de amplificación enzimática del ADN o del ARN, tal como en particular la técnica del TAS (siglas en inglés de Sistema de Amplificación basado en la Transcripción), propuesta por Kwok y col. (1989), la técnica 3SR (Replicación de Secuencias auto-Sostenida), descrita por Fahy y col. (1991), la técnica NASBA (Amplificación Basada en la Secuencia de Ácidos Nucleicos), descrita en el documento de patente EP 329822, o alternativamente, la técnica SDA (Amplificación por Desplazamiento de la Cadena), descrita por Walker y col., (1992) o la técnica de la Reacción en Cadena de la Ligasa (LCR), descrita en el documento de patente europea EP 0320308, o la Amplificación Mediada por Transcripción (TMA), descrita en el documento de patente de EE.UU. 5.399.491, o ventajosamente, la técnica de la PCR, tal y como describen Saiki y col. (1988) y los documentos de patentes europeas EP 0200362 y EP 0201184, o alternativamente, las técnicas derivadas de las anteriores y cualquier otro método deseado para amplificar secuencias de ácido nucleico *in vitro*.

El uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se contempla con más detalle en el contexto de la invención.

Tal y como se emplea en esta memoria, los términos “*cebador*” y “*sonda*”, se refieren a la función del oligonucleótido. Un cebador es un oligonucleótido empleado para amplificar una secuencia diana, típicamente mediante la extensión del oligonucleótido después de la hibridación con la secuencia diana o mediante ligación de múltiples oligonucleótidos que están adyacentes cuando se hibrida con la secuencia diana. Un oligonucleótido sonda se emplea para capturar o detectar una secuencia diana con la que se hibrida. Sin embargo, la misma sonda de oligonucleótido también puede actuar como cebador. Por tanto se apreciará que cualquiera de las secuencias descritas en esta memoria para la amplificación, la detección o la cuantificación del VHB, se puede utilizar como sonda para la hibridación o como cebadores para la amplificación para detectar o amplificar.

La expresión “*virus de la hepatitis B*” o “*VHB*”, significa la especie tipo del género *Orthohepadnavirus*, familia *Hepadnaviridae*. El ácido nucleico del VHB es un ADN circular parcialmente bicatenario y monocatenario. La longitud del genoma total es aproximadamente 3020-3320 nucleótidos (nt) (para la cadena de longitud completa), o 1700-2800 nt (para la cadena corta). Tal y como se emplea en esta memoria, VHB significa cualquier subtipo, cepa o variante, p. ej., el subtipo *ad*, *adr*, *adw*, *adyw*, *ar*, *ayw*. En el contexto de la invención, las posiciones de los nucleótidos

ES 2 332 712 T3

se indican haciendo referencia a la secuencia del genoma de VHB, el subtipo *adw*, depositado en GenBank con el número de entrada X98077 (SEQ ID NO:1).

5 La expresión “*muestra biológica*” se refiere a cualquier fluido corporal, tal como orina, sangre, suero, plasma, LCR o tejidos tales como biopsia de hígado.

Sondas y cebadores de la invención

10 Los inventores han mostrado que se puede conseguir una detección particularmente rápida y sensible de la infección con VHB, amplificando un ácido nucleico de VHB empleando los cebadores y las sondas específicos, tal y como se definen a continuación.

15 Estos cebadores y sondas se han diseñado para hibridarse con una región solapante del genoma de VHB, es decir, una región que incluye el final de la región codificadora de la polimerasa de ADN del VHB (nucleótidos (nt) 2307-3215/1-1623 del genoma circularizado de VHB) y el comienzo de la secuencia que codifica la proteína X de VHB (nt 1374-1838). Estos cebadores y sondas permiten la amplificación y la detección de un fragmento de 162 nucleótidos del genoma de VHB (una región que abarca desde el nt 1440 hasta el 1602 de la SEQ ID NO:1).

20 Los ensayos para la detección desarrollados en esta memoria, han resultado ser de gran interés para someter a ensayo cargas víricas de pacientes con VHB o para el escrutinio fiable de productos sanguíneos.

25 Por tanto, la invención proporciona un oligonucleótido que consiste en la secuencia 5' GCTGAATCCCGCGGAC GA 3', (SEQ ID NO:2) o su secuencia complementaria. Este oligonucleótido es particularmente útil como un cebador codificante para amplificar un ácido nucleico de VHB.

30 La invención también proporciona un oligonucleótido que consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo consistente en la secuencia 5' GTGCAGAGGTGAAGCGAAGTG 3' (SEQ ID NO:3), la secuencia 5' GTT CACGGTGGTCGCCATG 3' (SEQ ID NO:4), la secuencia 5' CGTTCACGGTGGTCGCCATGC 3' (SEQ ID NO:6) y la secuencia 5' CGTTCACGGTGGTCTCCATGC 3' (SEQ ID NO:7), así como sus secuencias complementarias. Estos oligonucleótidos son particularmente útiles como cebadores no codificantes para amplificar un ácido nucleico de VHB.

35 Además, la invención también proporciona un oligonucleótido, útil como sonda, que consiste en una secuencia que se une a VHB que consiste en una secuencia no codificante, seleccionada entre el grupo consistente en la secuencia 5' GGAGTCCGCGTAAAGAGAGGTG 3' (SEQ ID NO:8), la secuencia 5' GGAGACCGCGTAAAGAGAGGTG 3' (SEQ ID NO:9), la secuencia 5' GGAGTCTGCGTAAAGAGAGGTG 3' (SEQ ID NO:10), y la secuencia 5' GGA GACTGCGTAAAGAGAGGTG 3' (SEQ ID NO:11), así como sus secuencias complementarias.

40 Los oligonucleótidos de la invención pueden comprender posiblemente secuencias adicionales ligadas a los extremos 5' y/o 3' terminal de las secuencias indicadas anteriormente y que son ajenas a la secuencia deseada, tal como una secuencia para marcar. Dichos oligonucleótidos, sin embargo, son capaces de hibridarse bajo condiciones muy rigurosas con las secuencias nucleicas complementarias presentes en el VHB, y dichas secuencias adicionales son incapaces de hibridarse con el ácido nucleico de VHB bajo condiciones de hibridación convencionales.

45 Estas secuencias adicionales pueden servir como una secuencia espaciadora, enlazadora o para marcar o unirse a una enzima, etc.

50 El oligonucleótido de la invención, especialmente la sonda que consiste en una secuencia seleccionada a partir del grupo consistente en SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, y sus secuencias complementarias se pueden marcar de forma detectable.

Los agentes de marcación convencionales (p. ej., enzimas, restos radiactivos o fluorescentes) se pueden utilizar para este fin.

55 La marcación de la sonda es particularmente ventajosa para facilitar la detección del ácido nucleico amplificado, durante una reacción de amplificación/detección en “tiempo real”, es decir, durante un proceso de PCR en el que se detecta y/o se cuantifica la secuencia diana, mientras que la reacción de amplificación está teniendo lugar.

60 Dicha detección se puede conseguir, por ejemplo, empleando la tecnología de “Faro Molecular” (del inglés, “Molecular Beacon”) con ácidos nucleicos (Tyagi y Kramer, 1996; Cayouette y col., 1999). Según la tecnología de Faro Molecular, o bien el resto del fluoróforo o del inhibidor de la fluorescencia, se fija a cada extremo terminal de la secuencia que se investiga. En ausencia del ácido nucleico diana, las secuencias de los brazos se reasocian entre sí para formar de este modo una horquilla y una estructura de horquillas en forma de estrella que logra unir el fluoróforo con el inhibidor del fluoróforo. Cuando se ponen en contacto con el ácido nucleico diana, la secuencia complementaria que se investiga y la secuencia diana se hibridarán. Ya que la estrella de horquillas no puede coexistir con la doble hélice rígida que se forma después de la hibridación, el cambio conformacional resultante fuerza la separación de las secuencias de los brazos y provoca la separación del fluoróforo y del inhibidor del fluoróforo. Cuando el fluoróforo y el inhibidor del fluoróforo se separan, la señal fluorescente es detectable.

ES 2 332 712 T3

Se pueden utilizar todos los colorantes y los inhibidores de la fluorescencia conocidos en la técnica. De acuerdo con la invención, el colorante se puede seleccionar preferentemente entre el grupo consistente en Farn, Tet, Hex, Tamra, rojo Texas y Cy5, y el inhibidor se puede seleccionar preferentemente entre el grupo consistente en Dabcyl, Eclipse Dark Quencher y Black Hole Quenchers. Tales moléculas están a disposición en Eurogentec, Biosearch Technology, Proligo ...

La invención también proporciona, por tanto, un oligonucleótido que consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo consistente en SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, y sus secuencias complementarias y es portador de un resto fluoróforo en un extremo y un resto de inhibidor de la fluorescencia en el otro extremo. Las secuencias espaciadoras se introducen preferentemente para ligar dichos restos con una de las secuencias SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, o sus secuencias complementarias, de modo que proporcionen una sonda ampliada.

Los oligonucleótidos que consisten en las secuencias 5' **CGGCAGGAGTCCGCGTAAAGAGAGGTTGTGCCG** 3' (SEQ ID NO:12), 5' **CGGCAGGAGACCGCGTAAAGAGAGGTTGTGCCG** 3' (SEQ ID NO:13), 5' **CGGCAGGAGTCTGCGTAAAGAGAGGTTGTGCCG** 3' (SEQ ID NO:14) y 5' **CGGCAGGAGACTGCGTAAAGAGAGGTTGTGCCG** 3' (SEQ ID NO:15) son un ejemplo de tales sondas ampliadas y también forman parte de la presente invención. La pareja específica de secuencias de espaciadores se ha diseñado de cara a la secuencia del oligonucleótido particular a la que dichos espaciadores se tienen que fijar, y para proporcionar una sonda que pueda formar un bucle de horquilla. Una sonda ampliada de este modo que es portadora además de un resto fluoróforo en un extremo y un resto inhibidor de la fluorescencia en el otro extremo, es una sonda de faro molecular.

El uso de un oligonucleótido, tal y como se ha definido anteriormente, como sonda o cebador, para la hibridación y opcionalmente la amplificación de un ácido nucleico, procedente de un virus de la hepatitis B (VHB), también está dentro del alcance de la invención.

En relación con esto, la presente invención proporciona adicionalmente un primer grupo de oligonucleótidos, empleados como cebadores y que consisten en un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2 y al menos un oligonucleótido seleccionado entre el grupo consistente en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7. En particular, dicho primer grupo de oligonucleótidos puede consistir en un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:3, un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:4, un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:5, un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:6 y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:7. Preferentemente, dicho primer grupo de oligonucleótidos consiste en, (i) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:3, o (ii) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:4, o (iii) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:5, o (iv) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:6, o (v) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:7, o (vi) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:4 y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:5, o (vii) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:6, y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:7.

Más preferentemente, dicho primer grupo de oligonucleótidos, empleados como cebadores, consiste en SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:7; o SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7.

Otro objeto de la invención es un segundo grupo de oligonucleótidos útiles para amplificar y detectar el ácido nucleico de VHB, que comprende:

a) un grupo de oligonucleótidos que consisten en (i) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:3, o (ii) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:4, o (iii) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:5, o (iv) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:6, (v) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:7, (vi) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:4 y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:5, o (vii) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:6 y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:7;

b) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, o sus secuencias complementarias.

La invención proporciona adicionalmente un método para detectar específicamente un VHB mediante amplificación en una muestra biológica, cuyo método comprende las etapas consistentes en:

a) poner en contacto un primer grupo de oligonucleótidos, empleados como cebadores, tal y como se ha definido anteriormente, con una muestra biológica o una preparación de ácido nucleico obtenida a partir de una muestra bio-

ES 2 332 712 T3

lógica, bajo condiciones adecuadas para que los oligonucleótidos se hibriden con un ácido nucleico de VHB presente en la muestra;

5 b) amplificar dicho ácido nucleico de VHB mediante reacción en cadena de la polimerasa empleando dichos oligonucleótidos como cebadores;

c) detectar el producto de la amplificación, indicativo de la presencia de un VHB en la muestra biológica.

10 Preferentemente, la detección de dicho producto de la amplificación se realiza empleando un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, o sus secuencias complementarias, que están marcadas de forma detectable, como sondas. Tales sondas se pueden introducir en cualquier etapa. De forma conveniente, están presentes o se añaden a la mezcla de cebadores.

15 El método de la amplificación comprende generalmente las etapas consistentes en:

a) hibridar al menos un cebador oligonucleótido tal y como se ha definido anteriormente, con un ADN molde que consiste en un ADN de VHB que probablemente estará presente en una muestra biológica;

20 b) realizar una reacción de extensión del cebador para proporcionar un producto de extensión del cebador;

c) desnaturalizar el ADN dúplex resultante para separar el producto de extensión del cebador del ADN molde de VHB; actuando el producto de extensión del cebador como el otro ADN molde para el otro cebador, y

25 d) repetir un ciclo de reacción simultánea de extensión del cebador con dos cebadores oligonucleótidos, separar los productos de la extensión del cebador de los moldes de ADN e hibridar los cebadores para amplificar una región del ADN diana.

30 Dicha muestra biológica puede ser de cualquier tipo, p. ej., un fluido biológico, tal como sangre, suero, plasma o una muestra de tejido, tal como la que se puede obtener por biopsia del hígado. Más preferentemente, la muestra biológica es suero o plasma.

El método diagnóstico de la invención se puede realizar sobre una preparación de ácido nucleico (p. ej., ADN), obtenida a partir de dicha muestra biológica, por ejemplo, mediante procedimientos convencionales de extracción.

35 La invención proporciona adicionalmente un equipo de reactivos para amplificar VHB en una muestra biológica, comprendiendo dicho equipo de reactivos:

- al menos un primer grupo de oligonucleótidos de acuerdo con la invención, útiles como cebadores; y

40 - medios para amplificar un ácido nucleico de VHB.

Los medios para la amplificación pueden incluir por ejemplo una polimerasa de ADN termoestable, soluciones de dNTP, MgCl₂. La glicosilasa de ADN de uracilo también se puede utilizar para evitar la contaminación de la PCR.

45 Además, el equipo de reactivos puede comprender también un testigo negativo (es decir, una muestra exenta de ácido nucleico de VHB), un testigo positivo (es decir, una secuencia de ácido nucleico bicatenario de la región de VHB que se va a amplificar, clonada o no) y un testigo interno (es decir, una secuencia de ácido nucleico bicatenario, añadida a la muestra y cuya detección después de la amplificación se puede diferenciar de la diana).

50 El equipo de reactivos puede comprender ventajosamente una sonda tal y como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, puede comprender un oligonucleótido sintético que consiste en SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, o sus secuencias complementarias, marcadas de forma detectable e útiles como sondas.

55 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

60 Un experto en la técnica entenderá rápidamente que la invención incluye oligonucleótidos que tienen modificaciones de la secuencia, cuando se comparan con los oligonucleótidos descritos anteriormente (es decir, delección, adición y/o sustitución de un número limitado de nucleótidos), con la condición de que tales modificaciones no sean en detrimento de la sensibilidad y/o la especificidad de la detección de VHB conseguida empleando dicho oligonucleótido.

Figuras

65 La Figura 1 es una representación esquemática de comparaciones por parejas, de los resultados de la cuantificación proporcionados por el ensayo de acuerdo con la invención (con SEQ ID N° 2 y SEQ ID N° 3 como cebadores y SEQ ID N° 12 como sonda) mediante el equipo de reactivos para la PCR de VHB de Roche, y HBV NGI SuperQuant[®] LabCorp. A: invención frente al equipo de reactivos para PCR de VHB de Roche; B: invención frente

ES 2 332 712 T3

a HBV NGI SuperQuant LabCorp; C: HBV NGI SuperQuant LabCorp frente al equipo de reactivos para PCR de VHB de Roche.

5 La Figura 2 es una representación esquemática de la linealidad de la señal de detección frente al número de copias/ml del testigo positivo extraído y diluido de ADN Accurun® HBV 325, mediante el ensayo de acuerdo con la invención (con SEQ ID N° 2 y SEQ ID N° 3 como cebadores y SEQ ID N° 12 como sonda).

Ejemplo

10

Detección específica de VHB mediante PCR en “tiempo real”

Materiales y métodos

15

1) *Muestras*

Panel del genotipo de hepatitis B de TeraPro® (Teragenix, catálogo HBVGTP): 15 muestras positivas de VHB en plasma (n° 1 a 15) procedentes de 15 pacientes diferentes con diversos genotipos (3A, 1 B, 5C, 1 D, 3E, 2F).

20

Panel del genotipo mundial de hepatitis B de TeraPro® (Teragenix, catálogo HBVGTP-002a): una muestra positiva de VHB en plasma de genotipo G (n° 50).

25

Todas estas muestras se han genotipado con el equipo de reactivos de Visible Genetics (Trugene) y se han cuantificado con el equipo de reactivos para ADN de VHB de Roche y el equipo de reactivos para ADN de VHB de NGI (National Genetics Institute) SuperQuant.

Curva patrón para la cuantificación: uso de diluciones extraídas del panel de testigos positivos para ADN de VHB de Accurun 325 (BBI) o de la muestra n° 15 del panel del genotipo de hepatitis B de TeraPro® (Teragenix).

30

2) *Extracción*

35

El ADN se extrajo a partir de muestras de plasma empleando el miniequipo de reactivos para ADN de la sangre de QiaAmp, referencia Qiagen 51104 (200 µl de muestra empleada) o el equipo de reactivos a vacío de virus de QIAamp MinElute, referencia Qiagen 57714 (500 µl de muestra empleada), según con las recomendaciones del fabricante.

3) *Amplificación*

40

La PCR en tiempo real se realizó empleando la PCR cuantitativa Platino SuperMix UDG (Invitrogen 11730-017): mezcla 2X contiene 60 U/ml de polimerasa de ADN Platino, Tris-HCl 40 mM pH 8,4, KCl 100 mM, MgCl₂ 6 mM y dGTP 400 µM. Para la mezcla 1X se añade cebador 1,5 µM SEQ ID N° 2, cebador 0,3 µM SEQ ID N° 3 (o cebador 0,3 µM SEQ ID N° 4), una sonda inhibidora de la fluorescencia de faro molecular 0, 2 µM “Fam-Dark-Quencher” SEQ ID N° 12 (Eurogentec) y MgCl₂ 3 mM (para conseguir MgCl₂ 6 mM). Las muestras de ADN extraído se añadieron a

45

continuación a la mezcla que contenía los cebadores, la sonda y MgCl₂ adicional.

Las etapas de la amplificación fueron las siguientes:

50

- 1 x 2 minutos, 50°C (UDG está actuando)

- 1 x 2 minutos, 95°C (UDG está inactivada; la polimerasa de ADN Taq platino está activada)

- 50 x (15 segundos, 94°C-30 segundos, 55°C-30 segundos, 72°C)

55

- 4°C.

4) *Interpretación de los resultados*

60

Para cada ensayo se determina un ciclo umbral (Ct) que es el nivel de fluorescencia que se considera que va a ser significativamente superior al nivel de fondo de la fluorescencia, medida en los primeros ciclos de la amplificación. Una curva patrón de referencia se construye representando gráficamente el logaritmo de las concentraciones diana conocidas, frente al Ct correspondiente. La concentración de una muestra desconocida se define a continuación extrapolando el Ct correspondiente en la curva patrón.

65

ES 2 332 712 T3

Resultados

1) Comparación con métodos de detección existentes que se basan en la PCR

5 Catorce muestras (nº 1 hasta 14) procedentes del panel del genotipo de hepatitis B de TeraPro® (Teragenix) se diluyeron en plasma y se extrajeron con el equipo de reactivos para ADN de sangre de QiaAmp, se cuantificaron con uno de los ensayos de la invención (con SEQ ID Nº 2 y SEQ ID Nº 3 como cebadores y SEQ ID Nº 12 como sonda de tipo faro molecular) o con dos ensayos de detección comercializados, basados en la PCR: el equipo de reactivos de PCR para VHB de Roche (ensayo desarrollado para cuantificar hasta $2 \cdot 10^9$ copias/ml) y el equipo de reactivos para VHB de NGI SuperQuant de LabCorp (resultados comunicados por Teragenix).

10 Los cebadores y la sonda del equipo de reactivos de PCR para VHB de Roche se seleccionan en un segmento conservado de la región prenúcleo-núcleo, mientras que los cebadores y la sonda del equipo de reactivos para VHB de NGI SuperQuant de LabCorp, se seleccionan en un segmento conservado del gen de la polimerasa.

15

TABLA 1

Muestra			Equipo de reactivos de PCR para VHB Roche		Invención		NGI para VHB de SuperQuant® LabCorp	
Nº	Genotipo (resultados genéticos visibles)	Serotipo	Nº de copias/ml	Log de nº de copias/ml	Nº de copias/ml	Log de nº de copias/ml	Nº de copias/ml	Log de nº de copias/ml
1	A	adw2	$3,95 \cdot 10^8$	8,60	$1,34 \cdot 10^7$	7,12	$3 \cdot 10^8$	8,48
2	A	adw2	$3,1 \cdot 10^4$	4,49	263	2,34	$2,3 \cdot 10^4$	4,36
3	A	adw2	$9,7 \cdot 10^3$	3,99	$1,1 \cdot 10^3$	3,02	$1,1 \cdot 10^3$	3
4	B	adw2	$4,6 \cdot 10^5$	5,66	$1,66 \cdot 10^5$	5,21	$5,5 \cdot 10^5$	5,74
5	E	adw2	$8,7 \cdot 10^3$	3,94	566	2,75	$8,8 \cdot 10^3$	3,94
6	C	adr	$8,5 \cdot 10^8$	8,93	$2 \cdot 10^8$	8,3	$4,9 \cdot 10^8$	8,69
7	C	adr	$1,15 \cdot 10^5$	5,06	399	2,59	$3,1 \cdot 10^3$	3,49
8	C	adr	$6,7 \cdot 10^8$	8,83	$3,15 \cdot 10^8$	8,49	$3,4 \cdot 10^8$	8,53
9	C	ayw2	$1,2 \cdot 10^3$	3,08	494	2,65	10^3	3
10	C	ayw2	$4 \cdot 10^3$	3,60	101	2	$6,9 \cdot 10^3$	3,83
11	D	ayw2	$1,64 \cdot 10^9$	9,21	$1,52 \cdot 10^9$	9,17	$2 \cdot 10^9$	9,3
12	E	ayw4	$7,6 \cdot 10^4$	4,88	$1,01 \cdot 10^4$	4	$9,7 \cdot 10^4$	4,98
13	E	ayw4	$9,7 \cdot 10^3$	3,99	$2 \cdot 10^4$	4,27	10^4	4
14	F	ayw4	$10,6 \cdot 10^3$	4,03	$6,1 \cdot 10^3$	3,82	$7,4 \cdot 10^3$	3,86
50	G	ND	$>2 \cdot 10^9$ *	$>5,3$	$1,66 \cdot 10^7$	7,2	$2,9 \cdot 10^7$	7,46
15	F	ayw4	$1,35 \cdot 10^9$	9,13	Usado para calibración		$8,5 \cdot 10^8$	8,92

* esta muestra se ha cuantificado con el equipo de reactivos de Cobas Amplicor de VHB Monitor, con un margen de cuantificación de 200 a $2 \cdot 10^5$ copias/ml.

55

El ensayo de acuerdo con la invención es capaz de detectar y cuantificar específicamente los genotipos A hasta G de VHB.

60 Una comparación de conjunto de las parejas de los resultados obtenidos con los tres ensayos de acuerdo con la invención, muestra una buena correlación con los obtenidos con cada uno de los equipos de reactivos de PCR para VHB de Roche, o para VHB de NGI SuperQuant® de LabCorp (Figura 1).

65

ES 2 332 712 T3

2) Sensibilidad de la detección

a) Linealidad del intervalo de cuantificación

5 Para demostrar que la señal de detección (ciclo umbral) tal y como se había obtenido con el ensayo de la invención (con SEQ ID N° 2 y SEQ ID N° 3 como cebadores, y SEQ ID N° 12 como sonda de tipo faro molecular), se correlaciona con el número de copias de ADN de VHB por ml, la muestra número 15 procedente del panel del genotipo VHB de TeraPro® (Teragenix) se diluyó en plasma y se extrajo con el equipo de reactivos para ADN en sangre de QiaAmp. El ciclo umbral medido con diluciones crecientes de la muestra hasta el límite de detección (100 copias/ml) se indica en la Tabla 2 a continuación. La correlación lineal entre el número de copias y el ciclo umbral se ilustra en la Figura 2.

TABLA 2

Panel de TERAGENIX nº 15		Ciclo umbral (Ct)			Ct promedio	SD*	CV ^a	RFU [§]
copias/ml	Log de copias/ml	1	2	3				
10 ⁹	9	14,7	14,2	14,6	14,5	0,26	1,82%	2750/3000
10 ⁸	8	18,0	17,7	17,7	17,8	0,17	0,97%	2500/3250
10 ⁷	7	20,8	21,0	21,3	21,0	0,25	1,20%	2500/2750
10 ⁶	6	23,4	25,1	24,6	24,4	0,87	3,59%	2250/2400
10 ⁵	5	27,8	27,8	27,6	27,7	0,12	0,42%	2000
10 ⁴	4	30,2	30,4	31,5	30,7	0,70	2,28%	1500/1700
10 ³	3	34,3	35,3	33,8	34,5	0,76	2,22%	1000/1250
100	2	38,0	37,1	37,2	37,4	0,49	1,32%	600/750

*Desviación estándar

^a Coeficiente de variación en %

§ Unidad de fluorescencia relativa

35 Sobre las muestras positivas para VHB extraídas con el equipo de reactivos para ADN de sangre de QiaAmp de Qiagen, el ensayo de acuerdo con la invención es capaz de cuantificar VHB desde 100 hasta 10⁹ copias/ml con un coeficiente de correlación bueno (0,998) cuando el logaritmo del número de copias se representa gráficamente frente al ciclo umbral (Ct).

b) Sensibilidad de la detección

40 El testigo positivo para ADN de Accurun® HBV 325 (Boston Biomedica) se empleó como muestra de referencia para determinar el límite de la sensibilidad del ensayo de la invención (con SEQ ID N° 2 y SEQ ID N° 3 como cebadores y SEQ ID N° 12 como sonda de tipo faro molecular). Para ello, la muestra se diluyó en plasma y el ADN se extrajo con el equipo de reactivos para extracción de QIAamp MinElute, tal y como se ha explicado anteriormente. Los resultados de este análisis, indicados en la Tabla 3 a continuación, muestran que el ensayo de acuerdo con la invención facilita la detección hasta con sólo 25 copias/ml de la referencia de VHB de Accurun®, sobre muestras positivas para VHB, extraídas con el equipo de reactivos para extracción de QIAamp MinElute de Qiagen.

TABLA 3

VHB de Accurun		Ciclo Umbral (Ct)		Ct promedio	SD*	CV ^a	RFU [§]
nº de copias/ml	Log de nº de copias/ml	1	2				
2000	3,3	31,4	30,6	31,0	0,40	1,29%	500/360
500	2,7	33,5	32,4	33,0	0,55	1,67%	330/375
100	2	35,0	34,5	34,8	0,25	0,72%	250/300
50	1,7	36,6	36,4	36,5	0,10	0,27%	150/175
25	1,4	37,8	37,9	37,9	0,05	0,13%	80/150
10	1	N/A	N/A				0

*Desviación estándar

^a Coeficiente de variación en %

§ Unidad de fluorescencia relativa

ES 2 332 712 T3

El límite promedio de la sensibilidad se sometió adicionalmente a ensayo, con las mismas condiciones en cada una de las 15 muestras del panel del genotipo VHB de TeraPro® y en la muestra nº 50 del panel del genotipo mundial de hepatitis B de TeraPro®, tal y como se resume en la Tabla 4.

5

TABLA 4

10

15

20

25

30

35

Muestra	Genotipo (resultados genéticos visibles)	Ciclo umbral	log del nº de copias/ml	Nº de copias/ml estimadas
1	A	36,6	1,66	46
2	A	36,7	1,63	43
3	A	41	0,48	<25
4	B	34,9	1,69	140
5	E	38,2	1,2	16
6	C	40	0,7	<25
7	C	39,2	0,9	<25
8	C	38,4	1,14	14
9	C	38,9	1	<25
10	C	40,2	0,7	<25
11	D	36,9	1,58	38
12	E	38,4	1,14	14
13	E	40,1	0,7	<25
14	F	38,6	1,08	12
15	F	37,9	1,3	20
50	G	37,6	1,3	20
Límite de la sensibilidad promedio				< 32

40

Por tanto, el límite de la sensibilidad promedio del ensayo de la invención, tal y como se obtuvo con el panel de genotipo VHB de TeraPro® diluido en plasma y extraído con el equipo de reactivos a vacío para virus de QiaAmp Min Elute, se encontró que era muy cercano al límite de la sensibilidad promedio obtenido con el testigo positivo para ADN de Accurun® HBV 325 (límite de la detección <32 copias/ml comparado con 25 copias/ml).

45

El límite de la sensibilidad del ensayo de acuerdo con la invención se mejora comparado con los ensayos de detección que se basan en la PCR existentes en el mercado, tales como el equipo de reactivos de Cobas Amplicor HBV Monitor de Roche Diagnostics (límite de la sensibilidad 200 copias/ml) o el equipo de reactivos para el virus de la Hepatitis B de NGI SuperQuant de LabCorp (límite de la sensibilidad 100 copias/ml).

3) Comparación del grupo de cebadores SEQ ID N° 2 y SEQ ID N° 3 con el grupo de cebadores SEQ ID N° 2 y SEQ ID N° 4

50

Para esta comparación, se emplearon diluciones del testigo positivo para ADN de Accurun® HBV 325, extraído con el miniequipo de reactivos para ADN de sangre de QiaAmp. Los resultados de los ciclos umbrales (Ct) se indican en la Tabla 5.

55

TABLA 5

60

65

VHB de Accurun		SEQ ID N°2 + SEQ ID N°3				SEQ ID N° 2 + SEQ ID N° 4			
nº de copias/ml	Log de nº de copias/ml	Ct (1)	Ct (2)	Ct promedio	RFUs promedio	Ct (1)	Ct (2)	Ct promedio	RFUs promedio
10 ⁵	5	28,9	28,9	28,9	625	27,2	26,0	26,6	550
10 ⁴	4	31,6	31,6	31,6	500	30,0	31,6	30,8	350
10 ³	3	34,3	34,8	34,6	350	33,3	31,9	32,6	225
10 ²	2	37,5	ND	37,5	200	37,8	37,7	37,8	100

ES 2 332 712 T3

Ambos grupos de cebadores amplificaron las diluciones extraídas de VHB de Accurun con el mismo límite de sensibilidad (10^2 copias/ml), pero se obtuvo una mejor capacidad de reproducir el ciclo umbral y una correlación mejor con el grupo de cebadores SEQ ID N° 2 y SEQ ID N° 3 (coeficiente de correlación de 0,999) que el del grupo de cebadores SEQ ID N° 2 y SEQ ID N° 4 (coeficiente de correlación de 0,970).

5

Referencias

- **Ausubel** y col. (compiladores), *Current Protocols in Molecular Biology*, *John Wiley & Sons, Inc.* (1994)

10 - **Cayouette M, Sucharzuk A, Moores J, Tyagi S, y Kramer FR** (1999) "Using molecular beacons to monitor PCR product formation". *Strategies Newsl.* 12: 85-88.

- **Fahy** y col. (1991) *PCR Meth. Appl.*, 1,25-33

15 - **Kwoh** y col. (1989) *PNAS*, 86,1173-1177

- **Perbal**, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984)

- **Saiki** y col., (1988), *Science*, 239: 487

20

- **Sambrook, Fritsch & Maniatis**, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor*, Nueva York

- **Tyagi S y Kramer FR** (1996) *Nature Biotechnol.*, 16, 303-308

25

- **Walker** y col. (1992) *P. N. A. S.*, 89, 392-396

- **Yaron** y col., (1979) *Analytical Biochemistry* 95: 228-235.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 332 712 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligonucleótido que consiste en una secuencia seleccionada a partir del grupo consistente en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 y sus secuencias complementarias.
2. El oligonucleótido según la reivindicación 1, que consiste en SEQ ID NO: 2 o su secuencia complementaria.
3. El oligonucleótido según la reivindicación 1, que consiste en SEQ ID NO: 3 o su secuencia complementaria.
- 10 4. El oligonucleótido según la reivindicación 1, que consiste en SEQ ID NO: 4 o su secuencia complementaria.
5. El oligonucleótido según la reivindicación 1, que consiste en SEQ ID NO: 6 o su secuencia complementaria.
- 15 6. El oligonucleótido según la reivindicación 1, que consiste en SEQ ID NO: 7 o su secuencia complementaria.
7. Uso de un oligonucleótido tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, como sonda o cebador para la hibridación y la amplificación de un ácido nucleico procedente de un virus de la hepatitis B (VHB).
- 20 8. Uso de un oligonucleótido que consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo consistente en SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y sus secuencias complementarias, ligado opcionalmente en el extremo 5' y/o 3' terminal con secuencias adicionales incapaces de hibridarse con los ácidos nucleicos de VHB bajo condiciones de hibridación convencionales, como sonda para la hibridación con un ácido nucleico procedente de VHB.
- 25 9. El uso según la reivindicación 8, en el que dicho oligonucleótido consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo consistente en SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y sus secuencias complementarias.
- 30 10. El uso según la reivindicación 8, en el que dicho oligonucleótido incluye una secuencia seleccionada entre el grupo consistente en SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y sus secuencias complementarias, y es portador de un resto fluoróforo en un extremo, y un resto inhibidor de la fluorescencia en el otro extremo.
- 35 11. El uso según la reivindicación 10, en el que dicho oligonucleótido consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo consistente en SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:15, y es portador de un resto fluoróforo en un extremo y un resto inhibidor de la fluorescencia en el otro extremo.
- 40 12. Un grupo de oligonucleótidos que consisten en un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, y al menos un oligonucleótido seleccionado entre el grupo consistente en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7.
- 45 13. Un grupo de oligonucleótidos según la reivindicación 12, que consiste en:
- (i) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:3;
- (ii) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:4;
- (iii) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:5;
- (iv) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:6;
- 50 (v) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:7;
- (vi) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:4 y un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:5; y
- 55 (vii) un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:2, un oligonucleótido que consiste en SEQ ID NO:6; y un oligonucleótido que incluye SEQ ID NO:7.
14. Un grupo de oligonucleótidos que comprende:
- 60 a) un grupo de oligonucleótidos según la reivindicación 12 ó 13; y
- b) un oligonucleótido que incluye una secuencia seleccionada entre el grupo consistente en SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y sus secuencias complementarias.
- 65 15. Un grupo de oligonucleótidos según la reivindicación 14, que comprende:
- a) un grupo de oligonucleótidos según la reivindicación 12 ó 13; y

ES 2 332 712 T3

b) un oligonucleótido que consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo consistente en SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:15 y que es portador de un resto fluoróforo en un extremo y un resto inhibidor de la fluorescencia en el otro extremo.

5 16. Un método para detectar específicamente un VHB mediante la amplificación en una muestra biológica, cuyo método comprende las etapas consistentes en:

a) poner en contacto un grupo de oligonucleótidos según la reivindicación 12 ó 13, con una muestra biológica o una preparación de ácido nucleico obtenida a partir de una muestra biológica, bajo condiciones adecuadas para que los oligonucleótidos se hibriden con un ácido nucleico de VHB presente en la muestra;

b) amplificar dicho ácido nucleico de VHB empleando dichos oligonucleótidos como cebadores;

15 c) detectar el producto de la amplificación, indicativo de la presencia de un VHB en la muestra biológica.

17. El método según la reivindicación 16, en el que el ácido nucleico de VHB se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

20 18. El método según la reivindicación 16 ó 17, en el que la detección de dicho producto de la amplificación se realiza utilizando un oligonucleótido que incluye una secuencia seleccionada entre el grupo consistente en SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y sus secuencias complementarias, y que se marca de forma detectable como una sonda.

25 19. El método según la reivindicación 18, en donde dicho oligonucleótido incluye una secuencia seleccionada entre el grupo consistente en SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y sus secuencias complementarias, y es portador de un resto fluoróforo en un extremo terminal y un resto inhibidor de la fluorescencia en el otro extremo terminal.

30 20. El método según la reivindicación 18 ó 19, en donde dicho oligonucleótido que incluye una secuencia seleccionada entre el grupo consistente en SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y sus secuencias complementarias, es SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 o SEQ ID NO:15.

21. Un equipo de reactivos para amplificar VHB en una muestra biológica, cuyo equipo comprende:

35 - al menos un grupo de oligonucleótidos según la reivindicación 12 ó 13, útiles como cebadores;

- medios para amplificar un ácido nucleico de VHB.

40 22. El equipo de reactivos según la reivindicación 21, que comprende adicionalmente unos medios para la detección del producto amplificado.

23. El equipo de reactivos según la reivindicación 21 ó 22, en el que los medios para amplificar el ácido nucleico de VHB son medios para amplificar con la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

45 24. El equipo de reactivos según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, que comprende un oligonucleótido que incluye una secuencia seleccionada a partir del grupo consistente en SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y sus secuencias complementarias, marcada de forma detectable y útil como sonda.

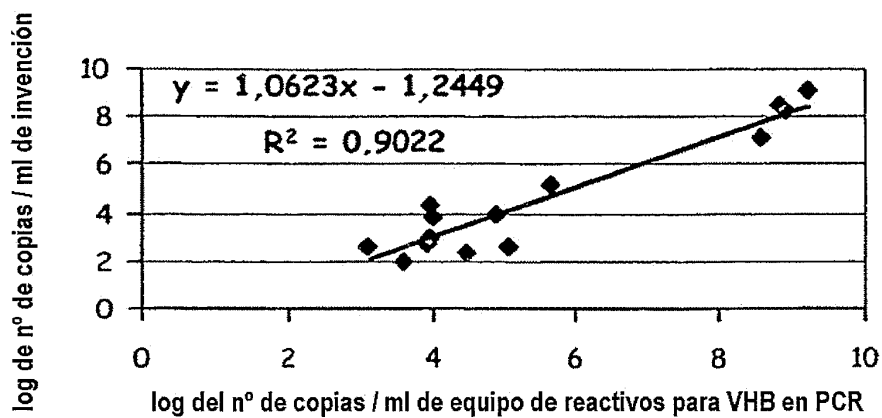
50 25. El equipo de reactivos según la reivindicación 24, en el que dicho oligonucleótido que incluye una secuencia seleccionada entre el grupo consistente en SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y sus secuencias complementarias, es SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 o SEQ ID NO:15.

55

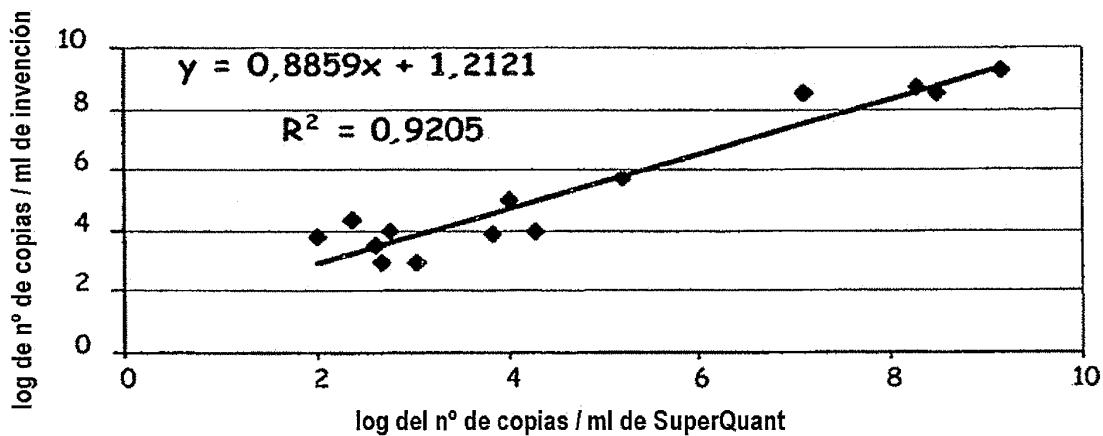
60

65

A.



B.



C.

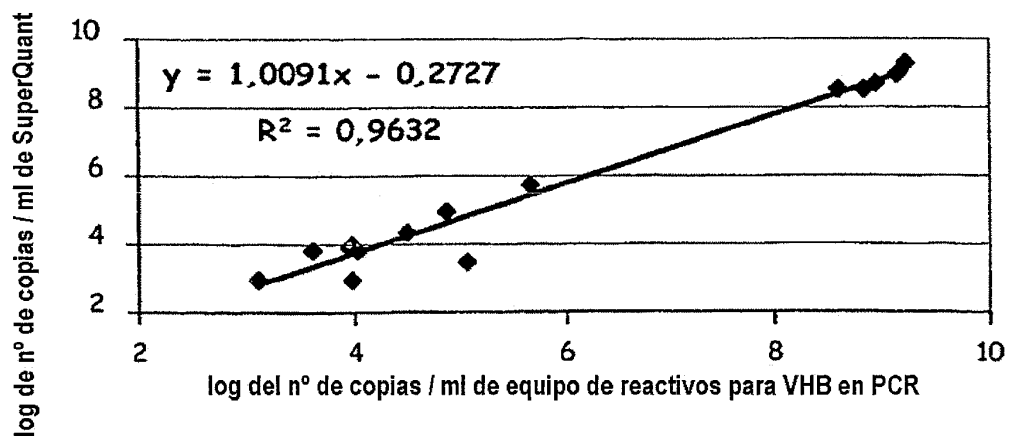


FIG.1

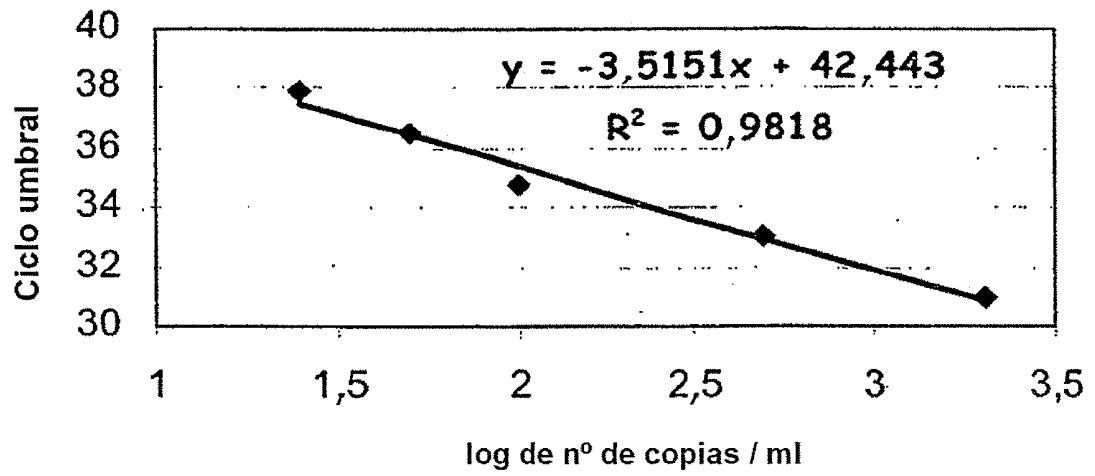


FIG.2

ES 2 332 712 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110>	BIO-RAD Pasteur						
5	<120>	Oligonucleótidos para la detección del virus de la hepatitis B					
	<130>	BET 03P0671					
10	<160>	15					
	<170>	PatentIn version 3.1					
15	<210>	1					
	<211>	3215					
	<212>	DNA					
	<213>	Virus de la hepatitis B					
20	<400>	1					
25	ctccaccact	ttccaccaa	ctcttcaaga	tcccagagtc	agggccctgt	accttccctgc	60
	tggtggctcc	agttcaggaa	cagtgagccc	tgctcagaat	actgtctctg	ccatatacgtc	120
	aatcttatcg	aagactgggg	accctgtgcc	gaacatggag	agcatcgcac	caggactcct	180
	aggacccctg	ctcgtgttac	aggcgggggt	tttcttggtg	acaaaaatcc	tcacaataacc	240
30	acagagtcta	gactcgtggg	ggacttctct	caattttcta	gggggaacac	ccgtgtgtct	300
	tggccaaaat	tcgcagtc	aaatctccag	tactcacca	acctgttgtc	ctccaacttg	360
35	tcttggttat	cgctggatgt	gtctgocggc	ttttatcctc	ttcctctgca	tctgtctgct	420
	atgcctcctc	ttcttggtgg	ttcttctgga	ctatcaagg	atgttgccc	tttgtcctct	480
	aattccagga	tcatcaacca	ccagcacggg	accatgcaag	acttgcacag	ctcctgctca	540
40	aggaacctct	atgtttccct	catgttgctg	tacaaaacct	acggacggaa	actgcacctg	600
	tattccctc	ccatcatctt	gggctttcgc	aaaaatccta	tgggagtg	cctcagtc	660
	tttctcttgg	ctcagtttac	tagtgccatt	tgttcagtg	ttcgtagggc	tttcccccc	720
45	tgtctggctt	tcagttatat	ggatgatgtg	gttttggggg	ccaagtctgt	acaacatctt	780
	gagtcctctt	ataccgctgt	taccaatctt	cttttgtctt	tgggtataca	tttaaacctt	840
	cacaaaacaa	aaagatgggg	atattccctt	aacttcatgg	gatatgtaat	tgggagttgg	900
50	ggcacattgc	cacaggaaca	tattgtacaa	aaaaatcaaaa	cgtgttttag	gaaacttctt	960
	gtaaacaggc	ctattgattg	gaaagtatgt	caacgaattg	tgggtctttt	ggggtttggc	1020
	gcccctttca	cgcaatgtgg	atatacctgct	ttaatgcctt	tatatgcatg	tatacaagca	1080
55	aaacaggctt	ttactttctc	gccaaacttac	aaggcctttc	taagtaaaca	gtatctgaac	1140
	ctttaecccg	ttgctcggca	acggcctggg	ctgtgccaa	tgtttgctga	cgcaaccctc	1200
	actggttggg	gcttgccat	aggccatcag	cgcatgcgtg	gaaccttgt	gtctcctctg	1260
60	ccgatccata	ctgcggaact	cctagccgct	tgttttgctc	gcagcaggtc	tggggcaaaa	1320

65

ES 2 332 712 T3

	ctcatcggga ctgacaatto tgtcgtgctc tcccgcaagt atacatcctt tccatggctg	1380
	ctaggctgtg ctgccaactg gatcctgctg gggacgtcct ttgtttacgt cccgtcggcg	1440
5	ctgaatcccc cggacgaccc ctcccggggc cgcttggggc tctaccgccc gcttctccgc	1500
	ctgttgtacc gaccgaccac gggggcgacc tctctttacg cggactcccc gtctgtgcct	1560
	tctcatctgc cggaccgtgt gcacttgcct tcacctctgc acgtcgcctg gagaccaccg	1620
10	tgaacgcccc caggaacctg cccaaggtct tgcataagag aactcttggc ctttcagcaa	1680
	tgtcaacgac cgaccttgag gcatacttca aagactgtgt gtttactgag tgggaggagt	1740
	tggggggagg ggttaggta atgatctttg tactaggagg ctgtaggcat aaattgggtc	1800
15	gttcaccage accatgcaac tttttcacct ctgcctaata atctcttggt catgtcctac	1860
	tgttcaagcc tccaagctgt gccttgggtg gctttgggac atggacattg acccgataaa	1920
	agaatttggg gcttctgtgg agttactctc ttttttgctt tctgacttct ttctctgtgt	1980
20	tcgagatctc ctgacaccg cctctgctct gtatcgggag gccttagagt ctccggaaca	2040
	ttgttcacct caccatacgg caatcaggca agctattctg tgttggggtg agttgatgaa	2100
	tctagccacc tgggtgggaa gtaatttggg agatcaagca tccagggact tagtagtcag	2160
25	ctatgtcaac gttaatatgg gcctaaaatt cagacaacta ttgtggtttc acatttctctg	2220
	tcttacgttt gggagacaaa ctgttcttga atatttgggt tcccttggag tgtggattcg	2280
	cactcctcct gcataatagac caccaaatgc ccctatctta tcaaaccttc cggaaactac	2340
30	tgttgttaga caaagaggca ggacccctag aagaagaact cctcgcctc gcagacgaag	2400
	gtctcaatcg ccgctgca gaagatctca atctcgggaa tctcaatgtt agtattcctt	2460
35	ggacacataa ggtgggaaac tttactgggc tttattcttc tacggtaacct tgccttaatc	2520
	ctaattggca aactccttct tttctgaca ttcatttgcg ggaggacatt gttgatagat	2580
	gtaagcaatt tgtggggccc cttacagtaa atgaaaacag gagactaaaa ttaattatgc	2640
40	ctgctagggt ttatcccaat gttactaaat atttgcctt agataaaggg atcaaaccgt	2700
	attatocaga gtatgtagt aatcattact tccagacgag acattattta cacactcttt	2760
	ggaaggcggg gatcttatat aaaagagagt ccacacgtag cgctcattt tgcgggtcac	2820
45	catattcttg ggaacaagat ctacagcatg ggaggttggt cttccaaacc tcgaaaaggc	2880
	atggggacaa atcttctgt ccccaatccc ctgggattct tccccgatca toagttggac	2940
	cctgcattca aagccaactc agacaatcca gattgggacc tcaacacgca caaggactac	3000
50	tggccggagc calggaaggl gggagtggga gcaltcgggc cagggttcac cctccccal	3060
	gggggactgt tggggtggag ccctcaggct cagggcctac tcacaactgt gccagcagct	3120
	cctcctcctg cctccaccaa tcggcagtcg ggaaggcagc ctactccctt atctccacct	3180
55	ctaagagaca ctcatccaca ggccatgaag tggaa	3215

<210> 2

<211> 18

60 <212> DNA

<213> Artificial Oligonucleótido

<400> 2

65 gctgaatccc gcggacga

18

<210> 3

ES 2 332 712 T3

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial: Oligonucleótido
5
<400> 3
gtgcagaggt gaagcgaagt g 21

10 <210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Oligonucleótido
15
<400> 4
gttcacggtg gtcgccatg 19

20 <210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Oligonucleótido
25
<400> 5
gttcacggtg gtctccatg 19

30 <210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Oligonucleótido
35
<400> 6
cgttcacggt ggtcgccatg c 21

40 <210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial: Oligonucleótido
45
<400> 7
cgttcacggt ggtctccatg c 21

50 <210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial: Oligonucleótido
55
<400> 8
ggagtccgcg taaagagagg tg 22

60 <210> 9
<211> 22
<212> DNA
65 <213> Artificial Oligonucleótido

ES 2 332 712 T3

	<400> 9		
	ggagaccgcg taaagagagg tg	22	
5	<210> 10		
	<211> 22		
	<212> DNA		
	<213> Artificial: Oligonucleótido		
10	<400> 10		
	ggagtctgcg taaagagagg tg	22	
15	<210> 11		
	<211> 22		
	<212> DNA		
	<213> Artificial: Oligonucleótido		
20	<400> 11		
	ggagactgcg taaagagagg tg	22	
25	<210> 12		
	<211> 32		
	<212> DNA		
	<213> Artificial: Oligonucleótido		
30	<400> 12		
	cggcaggagt ccgcgtaaag agaggtgtgc cg	32	
35	<210> 13		
	<211> 32		
	<212> DNA		
	<213> Artificial: Oligonucleótido		
40	<400> 13		
	cggcaggaga ccgcgtaaag agaggtgtgc cg	32	
45	<210> 14		
	<211> 32		
	<212> DNA		
	<213> Artificial: Oligonucleótido		
50	<400> 14		
	cggcaggagt ctgcgtaaag agaggtgtgc cg	32	
55	<210> 15		
	<211> 32		
	<212> DNA		
	<213> Artificial: Oligonucleótido		
60	<400> 15		
	cggcaggaga ctgcgtaaag agaggtgtgc cg	32	
65			