



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 349 543**

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

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **04815024 .7**
⑨6 Fecha de presentación : **16.12.2004**
⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1694871**
⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **30.08.2006**

⑤4 Título: **Composiciones, métodos y equipos para la detección de ácidos nucleicos del VIH-1 y VIH-2.**

③0 Prioridad: **19.12.2003 US 531183 P**
30.06.2004 US 584706 P

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.01.2011

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.01.2011

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

⑦2 Inventor/es: **Wu, Wen y**
Linnen, Jeffrey M.

⑦4 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 349 543 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).

COMPOSICIONES, MÉTODOS y EQUIPOS PARA LA DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DEL VIH-1 y VIH-2

5 Descripción

Campo de la invención

La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología. Más específicamente, la invención está relacionada con individual ensayos que pueden detectar los
10 ácidos nucleicos del VIH-1, VIH-2 o la combinación de VIH-1 y VIH-2. La invención además está relacionada con los ensayos multiplex que pueden detectar los ácidos nucleicos tanto del VIH-1 como del VIH-2 utilizando una sonda y/o cebadores con reacción cruzada con los dos analitos.

15 **Interés gubernamental de la invención**

Ciertos aspectos de la invención aquí descrita se realizaron con el apoyo del gobierno bajo los contratos del *National Heart, Lung and Blood Institute* del *National Institutes of Health* N01-HB-67130 y N01-HB-07148. El gobierno
20 de los Estados Unidos posee ciertos derechos en estos aspectos de la invención.

Antecedentes de la invención

Aunque la pandemia de VIH/ SIDA se debe principalmente a la infección por el VIH-1, un retrovirus diferente ha
25 emergido como causante de SIDA. Este virus llamado "VIH-2" se aisló por primera vez a partir de SIDA en el oeste de África en 1986, y se detectó posteriormente como un agente infeccioso por primera vez en los Estados Unidos el año si-

guiente. En los Estados Unidos se han informado menos de 100 casos de VIH-2 hasta finales de 1994. A pesar de estos valores aparentemente bajos, se ha identificado el VIH-2 como un agente etiológico en crecimiento causante de enfermedades con inmunosupresión que son clínicamente indistinguibles de los casos de SIDA resultantes de una infección por VIH-1 (Kanki et al., Science 232:238 (1986); Kanki et al., Science 236:827 (1987); Clavel et al., Science 233:343 (1986); Clavel et al., N. Engl. J. Med. 316:1180 (1987)).

10 Aunque el VIH-2 está relacionado con el VIH-1 en cuanto a su morfología y tropismo por las células CD4+, éste es claramente un virus distinto y no meramente una variante de la cubierta del VIH-1.

Además, como el VIH-2 sólo está relacionado de forma

15 lejana con el VIH-1, con aproximadamente un 50% de aminoácidos conservados en las proteínas *gag* y *pol* y menos de un 30% de conservación en los productos génicos *env*, su presencia no se detecta de forma efectiva en los ensayos serológicos utilizados para la detección de la infección por

20 VIH-1 (Constantine NT, SIDA 7:1 (1993); Markovitz DM, Ann. Intern. Med. 118:211 (1993)). En consecuencia, se han intentado desarrollar sondas de ácidos nucleicos que puedan utilizarse para detectar de forma específica los ácidos nucleicos virales del VIH-2.

25 De forma interesante, los genomas tanto del VIH-1 como del VIH-2 muestran una heterogeneidad de secuencia sustancial entre diferentes aislamientos. Como consecuencia de esta heterogeneidad, ha sido imposible encontrar regiones

sustanciales con una conservación absoluta de la secuencia entre todos los aislamientos del VIH-1 o todos los aislamientos del VIH-2 (véase la solicitud de patente europea publicada PE 0 887 427). Además, se han identificado numerosos aislamientos virales con secuencias de polinucleótido únicas para cada uno de estos virus, un factor que además complica la construcción de sondas para un análisis de ácidos nucleicos fiable y efectivo.

Ya que el VIH-2, como el VIH-1, también es transmisible a través de un intercambio de fluidos corporales, lo que incluye sangre y plasma, es importante poder detectar los fluidos corporales infectados antes de que los anticuerpos del virus sean detectables o los síntomas sean evidentes en un individuo infectado. Para la protección de los pacientes, que de otro modo podrían recibir un fluido corporal infectado con VIH-2 (por ejemplo sangre total o plasma durante una transfusión), o productos derivados de sangre o plasma de donaciones, es particularmente importante detectar la presencia de virus en los fluidos corporales de donación para evitar su utilización en tales procedimientos o productos. También es importante que los procedimientos y reactivos utilizados para la detección del VIH-2 puedan detectar un número relativamente bajos de copias virales que pueden estar presentes en un individuo infectado, que puede ser un donante, durante las fases tempranas de la infección.

Se han descrito previamente ensayos y reactivos para la detección del VIH-2 en, por ejemplo, las patentes esta-

dounidenses N° 6.020.123, 5.688.637, 5.545.726 y 5.310.651; las patentes europeas N° PE 0404625 B1 y PE 0239425 B1; y las solicitudes de patente europea publicadas N° PE 1026236 A2 y PE 0887427 A2.

5 **Resumen de la invención**

Un primer aspecto de la descripción está relacionada con un método para determinar si una muestra de ensayo contiene ácidos nucleicos analito del VIH-1 o ácidos nucleicos analito del VIH-2. El método incluye una primera fase en la
10 que se combina la muestra de ensayo con un par de cebadores con reactividad cruzada. A continuación, hay un paso de amplificación en una reacción de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos de una de entre cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos analito del VIH-1 que pueden estar
15 presentes en la muestra de ensayo y de una de entre cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos analito del VIH-2 que pueden estar presentes en la muestra de ensayo. Esta reacción de amplificación de ácidos nucleicos utiliza un par de cebadores con reactividad cruzada que pueden co-
20 amplificar los ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2. Los productos de la reacción pueden incluir un primer amplicón del VIH-1 y un primer amplicón del VIH-2. A continuación, hay una fase de detección en una única reacción de hibridación de uno de entre cualquiera de los primeros amplicones del
25 VIH-1 y de uno de entre cualquiera de los primeros amplicones del VIH-2 que pueden haberse sintetizado en la fase de amplificación. Un resultado positivo en la reacción de hibridación indicará que la muestra de ensayo contenía al

menos un ácido nucleico analito del VIH-1 o un ácido nucleico analito del VIH-2. En una realización preferible, la reacción de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos en la fase de amplificación es una reacción de TMA, una reacción de NASBA o una reacción de PCR. En otra realización preferible, la única reacción de hibridación de la fase de detección involucra la utilización de una sonda con reactividad cruzada que puede hibridar con el primer amplicón del VIH-1 o con el primer amplicón del VIH-2. Más preferiblemente, la reacción de hibridación en la fase de detección además incluye una sonda específica del VIH-1 que hibrida sólo con el primer amplicón del VIH-1 y no con el primer amplicón del VIH-2. Cuando este es el caso, una señal positiva que indica la hibridación de la sonda con reactividad cruzada junto con la ausencia de una señal positiva indicativa de hibridación de la sonda específica del VIH-1 indica que la muestra de ensayo contiene los ácidos nucleicos analito del VIH-2 y no contiene los ácidos nucleicos analito del VIH-1. En una realización preferible alternativa, hay una fase adicional de detección en una reacción de hibridación que incluye una sonda específica del VIH-1, sólo del primer amplicón del VIH-1, y no se detecta el primer amplicón del VIH-2. En este ejemplo, la sonda específica del VIH-1 hibrida solamente con el primer amplicón del VIH-1 y no con el primer amplicón del VIH-2. Cuando este es el caso, una señal positiva que indica hibridación de la sonda con reactividad cruzada junto con la ausencia de una señal positiva que indica hibridación de la sonda específica del

VIH-1 indica que la muestra de ensayo contiene los ácidos nucleicos analito del VIH-2 y no contiene los ácidos nucleicos analito del VIH-1. De acuerdo con otra realización preferible, la sonda con reactividad cruzada utilizada en la fase de detección está marcada con una señal detectable de forma homogénea. La señal detectable de forma homogénea puede ser, por ejemplo, un marcaje quimioluminiscente. En una realización altamente preferible, cuando se utiliza un marcaje quimioluminiscente, la fase de detección involucra la detección con un luminómetro, o realizar una luminometría. En ciertas realizaciones distintas del método, la reacción de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos realizada en la fase de amplificación no incluye un par de cebadores específicos del analito que amplifiquen la primera secuencia de ácidos nucleicos analito del VIH-2 sin amplificar también una primera secuencia de ácidos nucleicos analito del VIH-1. En otras realizaciones, un resultado positivo que indica una hibridación de la sonda en la fase de detección no distingue entre la presencia del primer amplión del VIH-1 y el primer amplicón del VIH-2. Dicho de otro modo, la hibridación de la sonda a los ácidos nucleicos complementarios diana sintetizados en la reacción de amplificación indica solamente que los ácidos nucleicos de VIH-1 o VIH-2 están presentes en la muestra de ensayo, sin identificar cual está presente. En otras realizaciones, la reacción de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos en la fase de amplificación además puede amplificar al menos una primera secuencia de al menos un ácido nucleico analito que

es diferente del VIH-1 y VIH-2. En este ejemplo la reacción de amplificación sería una reacción de amplificación "multiplex". En una realización particularmente preferible del método, los ácidos nucleicos de al menos uno de entre los virus de la hepatitis B y de la hepatitis C pueden amplificarse en la reacción de amplificación además de los ácidos nucleicos del VIH-1 y VIH-2.

Un segundo aspecto de la descripción está relacionada con un método concretamente para determinar si una muestra de ensayo contiene un ácido nucleico analito del VIH-1. El método incluye una primera fase en la que se combina la muestra de ensayo con un par de cebadores con reactividad cruzada. A continuación, hay una fase de amplificación en una reacción de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos de una de entre cualquiera de las secuencias de los ácidos nucleicos analito del VIH-1 que pueden estar presentes en la muestra de ensayo, y de una de entre cualquiera de las secuencias de los ácidos nucleicos analito del VIH-2 que pueden estar presentes en la muestra de ensayo. Esta reacción de amplificación se realiza utilizando un par de cebadores con reactividad cruzada que pueden coamplificar los ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2. Los productos de la reacción de amplificación pueden incluir un primer amplicón del VIH-1 y un primer amplicón del VIH-2. A continuación, hay una fase de detección del primer amplicón del VIH-1 que puede haberse sintetizado en la fase de amplificación sin detectar el primer amplicón del VIH-2. Un resultado positivo en la reacción de hibridación indicará que la muestra de

ensayo contenía el ácido nucleico analito del VIH-1. En una realización preferible, la reacción de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos en la fase de amplificación es una reacción de TMA, una reacción de NASBA o una reacción de PCR. Cuando se utiliza una de estas reacciones de amplificación, la fase de detección preferiblemente involucra la hibridación de una sonda de hibridación específica del VIH-1 que está marcada con una señal detectable de forma homogénea. Tales marcajes, de forma ventajosa, no requieren una separación física de la sonda libre no hibridada de los complejos específicos sonda:diana para determinar la formación de tales complejos en una reacción de hibridación. En ciertas realizaciones preferibles, la señal detectable de forma homogénea es un marcaje quimioluminiscente. Cuando éste es el caso, la fase de detección puede involucrar la detección con un luminómetro o realizar una luminometría. En otra realización, la reacción de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos en la fase de amplificación no incluye un par de cebadores específicos de analito que amplifique la primera secuencia de los ácidos nucleicos analito del VIH-2 sin amplificar también la primera secuencia de los ácidos nucleicos analito del VIH-1. En otras realizaciones, la reacción de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos en la fase de amplificación puede amplificar además al menos una primera secuencia de al menos un ácido nucleico analito que es diferente del VIH-1 y VIH-2. En este ejemplo la reacción de amplificación sería una reacción de amplificación "multiplex". Por ejemplo, en una realización parti-

cularmente preferible del método, los ácidos nucleicos de al menos uno de entre los virus de la hepatitis B y la hepatitis C pueden amplificarse en la reacción de amplificación además de los ácidos nucleicos del VIH-1 y VIH-2.

5 Un tercer aspecto de la descripción está relacionada con un método para determinar concretamente si una muestra de ensayo contiene un ácido nucleico analito del VIH-2. El método incluye una primera fase en la que se combina la muestra de ensayo con un par de cebadores con reactividad
10 cruzada. A continuación, hay una fase de amplificación en una reacción de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos de una de entre cualquiera de las secuencias de los ácidos nucleicos analito del VIH-1 que pueden estar presentes en la muestra de ensayo, y de una de entre cualquiera de las
15 secuencias de los ácidos nucleicos analito del VIH-2 que pueden estar presentes en la muestra de ensayo. Esta reacción de amplificación se realiza utilizando un par de cebadores con reactividad cruzada que pueden coamplificar los ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2. Los productos de la re-
20 acción de amplificación pueden incluir un primer amplicón del VIH-1 y un primer amplicón del VIH-2. A continuación, hay una fase de detección del primer amplicón del VIH-2 que puede haberse sintetizado en la fase de amplificación sin detectar el primer amplicón del VIH-1. Un resultado positi-
25 vo en la reacción de hibridación indicará que la muestra de ensayo contenía el ácido nucleico analito del VIH-2. En una realización preferible, la reacción de amplificación *in vi-
tro* de ácidos nucleicos en la fase de amplificación es una

reacción de TMA, una reacción de NASBA o una reacción de PCR. Cuando se utiliza una de estas reacciones de amplificación, la fase de detección preferiblemente involucra la hibridación de una sonda de hibridación específica del VIH-2 que está marcada con una señal detectable de forma homogénea. Tales marcajes, de forma ventajosa, no requieren una separación física de la sonda libre no hibridada de los complejos específicos sonda:diana para determinar la formación de tales complejos en una reacción de hibridación. En ciertas realizaciones preferibles, la señal detectable de forma homogénea es un marcaje quimioluminiscente. Cuando éste es el caso, la fase de detección puede involucrar la detección con un luminómetro o realizar una luminometría. En otra realización, la reacción de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos en la fase de amplificación no incluye un par de cebadores específicos de analito que amplifique la primera secuencia de los ácidos nucleicos analito del VIH-2 sin amplificar también la primera secuencia de los ácidos nucleicos analito del VIH-1. En otras realizaciones, la reacción de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos en la fase de amplificación puede amplificar además al menos una primera secuencia de al menos un ácido nucleico analito que es diferente del VIH-1 y VIH-2. En este ejemplo la reacción de amplificación sería una reacción de amplificación "multiplex". Por ejemplo, en una realización particularmente preferible del método inventado, los ácidos nucleicos de al menos uno de entre los virus de la hepatitis B y la hepatitis C pueden amplificarse en la reacción de

amplificación además de los ácidos nucleicos del VIH-1 y VIH-2.

Un cuarto aspecto de la descripción está relacionado con un método para determinar si una muestra de ensayo contiene un ácido nucleico analito del VIH-1. El método involucra una primera amplificación en una primera reacción de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* de una de entre cualquiera de las secuencias de los ácidos nucleicos analito del VIH-1 que pueden estar presentes en la muestra de ensayo, y de una de entre cualquiera de las secuencias de los ácidos nucleicos analito del VIH-2 que pueden estar presentes en la muestra de ensayo. La primera reacción de amplificación utiliza un par de cebadores con reactividad cruzada que pueden coamplificar los ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2. Los productos de la reacción de amplificación pueden incluir un primer amplicón del VIH-1 y un primer amplicón del VIH-2. A continuación, hay una fase de detección en una única reacción de hibridación de cualquiera de los primeros amplicones del VIH-1 y cualquiera de los primeros amplicones del VIH-2 que pueden haberse sintetizado en la primera reacción de amplificación. La detección de uno de los amplicones confirma que la muestra de ensayo contiene los ácidos nucleicos de VIH-1 o VIH-2. El siguiente paso es amplificar en una segunda reacción de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos cualquier segunda secuencia de los ácidos nucleicos analito del VIH-1 que pueden estar presentes en la muestra de ensayo, resultando así en la síntesis de un segundo amplicón del VIH-1. Finalmente,

hay una fase de detección del segundo amplicón del VIH-1 utilizando una sonda que hibrida con el segundo amplicón del VIH-1 pero no con ninguno de los amplicones del VIH-2 que pueden haberse sintetizado en la segunda fase de amplificación. La detección del segundo amplicón del VIH-1 confirmará que la muestra de ensayo contiene el ácido nucleico analito del VIH-1. En una realización preferible, la reacción de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos en la primera fase de amplificación es una reacción de TMA, una reacción de NASBA o una reacción de PCR. Cuando éste es el caso, la reacción de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos en la segunda fase de amplificación también puede ser una reacción de TMA, una reacción de NASBA o una reacción de PCR. En una realización alternativa, la reacción de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos en la segunda fase de amplificación es una reacción de TMA, una reacción de NASBA o una reacción de PCR, independientemente del tipo de reacción de amplificación utilizada en la primera fase de amplificación. De acuerdo con una realización preferible diferente, la primera reacción de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos y la segunda reacción de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos utilizan diferentes cebadores para sintetizar el primer amplicón del VIH-1 y el segundo amplicón del VIH-1. De acuerdo con otra realización preferible diferente, la primera y segunda fase de detección no utilizan sondas idénticas. Sin embargo, es preferible que en la única reacción de hibridación de la primera fase de amplificación se incluya una sonda con reactividad cruzada

que pueda hibridar con el primer amplicón del VIH-1 o con el primer amplicón del VIH-2. Aún más preferiblemente, la sonda con reactividad cruzada está marcada con una señal detectable de forma homogénea. En ciertas realizaciones, la
5 señal detectable de forma homogénea es, por ejemplo, un marcaje quimioluminiscente.

Un quinto aspecto de la descripción está relacionado con un método para amplificar los ácidos nucleicos analito del VIH-1 y los ácidos nucleicos analito del VIH-2 que pueden estar presentes en una muestra de ensayo. El método empieza con el paso de combinar la muestra de ensayo con un par de cebadores. Estos cebadores incluyen un primer cebador con reactividad cruzada que hibrida independientemente con cualquier primera cadena de ácidos nucleicos analito del VIH-1 y cualquier primera cadena de ácidos nucleicos analito del VIH-2, si están presentes en la muestra de ensayo. También se incluyen en el par de cebadores con reactividad cruzada un segundo cebador con reactividad cruzada que independientemente hibrida con cualquier segunda cadena de ácidos nucleicos analito del VIH-1 y cualquier segunda
10 cadena de ácidos nucleicos analito del VIH-2, si están presentes en la muestra de ensayo. Los cebadores poseen secuencias tales que un producto de extensión de los primeros cebadores con reactividad cruzada, utilizando como molde la primera cadena de ácidos nucleicos analito del VIH-1 o la primera cadena de ácidos nucleicos analito del VIH-2, hibrida con el segundo cebador con reactividad cruzada. A continuación, hay una fase de amplificación en una reacción
15
20
25

de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos de una de entre cualquiera de las secuencias de los ácidos nucleicos analito del VIH-1 que pueden estar presentes en la muestra de ensayo y de una de entre cualquiera de las secuencias de los ácidos nucleicos analito del VIH-2 que pueden estar presentes en la muestra de ensayo, utilizando el par de cebadores con reactividad cruzada. Esto resulta en la síntesis de un primer amplicón del VIH-1 si la muestra de ensayo contiene los ácidos nucleico analito del VIH-1, y en la síntesis de un primer amplicón del VIH-2 si la muestra de ensayo contiene los ácidos nucleicos analito del VIH-2. En una realización, el método inventado además incluye una fase de detección de al menos un primer amplicón del VIH-1 y un primer amplicón del VIH-2. En una realización preferible, la fase de detección involucra detectar tanto el primer amplicón del VIH-1 como el primer amplicón del VIH-2. Más preferiblemente, la fase de detección involucra realizar una reacción de hibridación que incluye una sonda con reactividad cruzada que hibrida independientemente con el primer amplicón del VIH-1 y con el primer amplicón del VIH-2 sintetizados en la fase de amplificación. En otra realización preferible, la fase de detección involucra la detección sólo del primer amplicón del VIH-1 y no del primer amplicón del VIH-2. En otra realización preferible, la fase de detección involucra la detección sólo del primer amplicón del VIH-2 y no del primer amplicón del VIH-1. De acuerdo con otra realización preferible, cuando el método inventado además incluye una fase de detección de al menos un

primer amplicón del VIH-1 y un primer amplicón del VIH-2, es preferible que (a) la primera secuencia de los ácidos nucleicos analito del VIH-1 se encuentre en el gen de la integrasa p31 del VIH-1 y que la primera secuencia de los ácidos nucleicos analito del VIH-2 se encuentre en el gen de la integrasa p31 del VIH-2, o (b) la primera secuencia de los ácidos nucleicos analito del VIH-1 se encuentre en el gen de la transcriptasa reversa p51 del VIH-1 y la primera secuencia de los ácidos nucleicos analito del VIH-2 se encuentre en el gen de la transcriptasa reversa p51 del VIH-2.

Un sexto aspecto de la descripción está relacionada con una composición para amplificar ácidos nucleicos analito de VIH-1 o VIH-2 que pueden estar presentes en una muestra biológica. La composición incluye un primer cebador con reactividad cruzada que hibrida independientemente con una primera cadena de ácidos nucleicos analito del VIH-1 o una primera cadena de ácidos nucleicos analito del VIH-2, si está presente en la muestra biológica. También se incluyen en la composición un segundo cebador con reactividad cruzada que hibrida independientemente con una segunda cadena de ácidos nucleicos analito del VIH-1 y una segunda cadena de ácidos nucleicos analito del VIH-2, si está presente en la muestra biológica. La naturaleza de los cebadores con reactividad cruzada implica que un producto de extensión del primer cebador con reactividad cruzada, mediado por la actividad de una polimerasa de DNA dependiente de molde, utilizando la primera cadena de ácidos nucleicos analito del

VIH-1 o VIH-2 como molde, puede hibridar con el segundo cebador con reactividad cruzada. En una realización preferible, los ácidos nucleicos analito del VIH-1 y VIH-2 que pueden amplificarse mediante el primer y segundo cebador con reactividad cruzada codifican la integrasa p31 viral o la transcriptasa reversa p51 viral. Otras realizaciones más preferibles de la composición no incluyen un par de cebadores específicos del VIH-2 para amplificar sólo los ácidos nucleicos analito del VIH-2 sin amplificar también los ácidos nucleicos analito del VIH-1, pero pueden incluir un par de cebadores específicos del VIH-1 para amplificar sólo los ácidos nucleicos analito del VIH-1 sin amplificar también los ácidos nucleicos analito del VIH-2. De acuerdo con otra realización, independientemente de si el primer y segundo cebador con reactividad cruzada son útiles para amplificar los ácidos nucleicos que codifican la integrasa p31 o la transcriptasa reversa p51, la composición además puede incluir un par de cebadores específicos del VIH-1 para amplificar sólo los ácidos nucleicos analito del VIH-1 sin amplificar también los ácidos nucleicos analito del VIH-2. En general, cuando el primer y segundo cebador con reactividad cruzada son útiles para amplificar los ácidos nucleicos que codifican la transcriptasa reversa p51, el primer cebador con reactividad cruzada incluye una secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal y opcionalmente una secuencia situada río arriba del primer cebador con reactividad cruzada que no es complementaria a la secuencia de los ácidos nucleicos analito a amplificar. La secuencia

complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del primer cebador con reactividad cruzada incluye unas 22-28 bases contiguas contenidas en el Id. de Sec. N°: 60, permitiendo la presencia de bases equivalentes de RNA y DNA y análogos de nucleótido. La composición además incluye un
5 segundo cebador con reactividad cruzada que incluye una secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal y opcionalmente una secuencia río arriba del segundo cebador con reactividad cruzada que no es complementaria de la
10 secuencia diana de ácidos nucleicos a amplificar. La secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del segundo cebador con reactividad cruzada incluye el Id. de Sec. N°: 61, permitiendo la presencia de bases equivalentes de RNA y DNA y análogos de nucleótido. Más preferi-
15 blemente, la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del primer cebador con reactividad cruzada consiste en 22-28 bases contiguas contenidas en el Id. de Sec. N°:60, permitiendo la presencia de bases equivalentes de RNA y DNA y análogos de nucleótido, y la secuencia
20 complementaria a la diana del extremo 3' terminal del segundo cebador con reactividad cruzada consiste en el Id. de Sec. N°: 61, permitiendo la presencia de bases equivalentes de RNA y DNA y análogos de nucleótido. En ciertas realización preferibles, el primer cebador y el segundo cebador
25 son cada uno de ellos de hasta 60 bases de longitud. En otras realizaciones preferibles, el primer cebador no incluye la secuencia opcional río arriba del primer cebador, el primer cebador es de hasta 28 bases de longitud, y el

segundo cebador es de hasta 60 bases de longitud. En otras realizaciones preferibles, el primer cebador es de hasta 60 bases de longitud, y el segundo cebador no incluye la secuencia opcional río arriba del segundo cebador, el segundo

5 cebador tiene 26 bases de longitud. En otra realizaciones preferibles, el primer cebador no incluye la secuencia opcional río arriba del primer cebador, el primer cebador es de hasta 28 bases de longitud, y el segundo cebador no incluye la secuencia opcional río arriba del segundo cebador,

10 y el segundo cebador es de 26 bases de longitud. Cuando este es el caso, lo que significa que el primer cebador es de hasta 28 bases de longitud y el segundo cebador es de 26 bases de longitud, hay ciertas combinaciones preferibles de cebadores que pueden utilizarse en la combinación. En una

15 primera combinación preferible, la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del primer cebador es el Id. de Sec. N°: 51, y la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del segundo cebador es el Id. de Sec. N°: 47, Id. de Sec. N°: 49 o Id. de Sec. N°:

20 50. En una segunda combinación preferible, la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del primer cebador es el Id. de Sec. N°: 52, y la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del segundo cebador es el Id. de Sec. N°:48. En una tercera com-

25 binación preferible, la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del primer cebador es el Id. de Sec. N°: 53 y la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del segundo cebador es el Id. de Sec.

Nº: 47, Id. de Sec. Nº: 49 o Id. de Sec. Nº: 50. En una cuarta combinación preferible, la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del primer cebador es el Id. de Sec. Nº: 54, y la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del segundo cebador es el Id. de Sec. Nº: 48. En una realización diferente, cuando el primer cebador y el segundo cebador son cada uno de ellos de hasta 60 bases de longitud, la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del primer cebador es cualquiera de los Id. de Sec. Nº: 51-54.

Más preferiblemente, la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del segundo cebador es cualquiera de los Id. de Sec. Nº: 47-50. En otra realización diferente preferible, cuando el primer cebador es de hasta 60 bases de longitud, y cuando el segundo cebador no incluye la secuencia opcional río arriba del segundo cebador, el segundo cebador es de 26 bases de longitud, y la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del segundo cebador es cualquiera de los Id. de Sec. Nº: 47-50. Más preferiblemente, el primer cebador incluye la secuencia río arriba del primer cebador opcional, y la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del primer cebador es cualquiera de los Id. de Sec. Nº: 51-54. Cuando éste es el caso, existen ciertas combinaciones preferibles de cebadores que pueden utilizarse en la combinación. En una primera combinación preferible, la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del primer cebador es el Id. de Sec. Nº: 51, y la secuencia

complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del segundo cebador es cualquiera de entre los Id. de Sec. N°: 47, Id. de Sec. N°: 49 e Id. de Sec. N°: 50. En una segunda combinación preferible, la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del primer cebador es el Id. de Sec. N°: 52, y la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del segundo cebador es al Id. de Sec. N°: 48. En una tercera combinación preferible, la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del primer cebador es el Id. de Sec. N°: 53, y la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del segundo cebador es cualquiera de entre los Id. de Sec. N°: 47, Id. de Sec. N°: 49 e Id. de Sec. N°: 50. En una cuarta combinación preferible, la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del primer cebador es el Id. de Sec. N°: 54, y la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del segundo cebador es el Id. de Sec. N°: 48. De nueva, en general, cuando el primer y segundo cebador con reactividad cruzada son útiles para amplificar ácidos nucleicos que codifican la integrasa p31, el primer cebador con reactividad cruzada incluye una secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal y opcionalmente una secuencia río arriba del primer cebador con reactividad cruzada que no es complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos analito a amplificar. La secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del primer cebador con reactividad cruzada consiste en cualquiera de los Id. de Sec. N°: 13-15. La composición

además incluye un segundo cebador con reactividad cruzada que incluye una secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal y opcionalmente una secuencia río arriba del segundo cebador con reactividad cruzada que no es complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana a amplificar. La secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del segundo cebador con reactividad cruzada incluye la secuencia ACARYAGTACWAATGGC (Id. de Sec. N°: 10), que permite la sustitución de hasta dos análogos de base. En una realización preferible, el primer cebador con reactividad cruzada y el segundo cebador con reactividad cruzada son cada uno de ellos de hasta 75 bases de longitud. Más preferiblemente, la secuencia complementaria a la diana en el extremo 3' terminal del segundo cebador con reactividad cruzada es cualquiera de entre los Id. de Sec. N°: 2, Id. de Sec. N°: 7, Id. de Sec. N°: 8 e Id. de Sec. N°: 9. Aún más preferiblemente, el primer cebador con reactividad cruzada es el Id. de Sec. N°: 14, y el segundo cebador con reactividad cruzada es cualquiera de entre los Id. de Sec. N°: 2, Id. de Sec. N°: 7, Id. de Sec. N°: 8 e Id. de Sec. N°: 9. De acuerdo con una realización aún más preferible, el primer cebador con reactividad cruzada es el Id. de Sec. N°: 14, y el segundo cebador con reactividad cruzada es el Id. de Sec. N°: 7, o el primer cebador con reactividad cruzada es el Id. de Sec. N°: 14, y el segundo cebador con reactividad cruzada es el Id. de Sec. N°: 2.

Un séptimo aspecto de la descripción está relacionado con a sonda para la detección de un ácido nucleico del VIH-

1 o del VIH-2. La sonda inventada incluye una secuencia
sonda que consiste en una secuencia de bases complementa-
rias a la diana, y opcionalmente una o más secuencias de
bases que no son complementarias a los ácidos nucleicos que
5 se desea detectar. La secuencia de bases complementaria a
la diana puede ser cualquiera de las siguientes: (a) Id. de
Sec. N°: 42 o la complementaria de la misma, permitiendo la
presencia de bases equivalentes de RNA y DNA; (b) Id. de
Sec. N°: 43 o la complementaria de la misma, permitiendo la
10 presencia de bases equivalentes de RNA y DNA; o (c) Id. de
Sec. N°: 44 o la complementaria de la misma, permitiendo la
presencia de bases equivalentes de RNA y DNA. En todos los
ejemplos la sonda de hibridación posee una longitud de has-
ta 60 bases. En una realización preferible, la sonda además
15 incluye a señal detectable. Por ejemplo, la señal detecta-
ble puede ser un marcaje quimioluminiscente. De acuerdo con
una realización diferente, la longitud de la sonda de
hibridación es de hasta 26 bases. De acuerdo con una reali-
zación diferente, la sonda no incluye una o más de las se-
20 cuencias de bases opcionales que no son complementarias a
los ácidos nucleicos que se desea detectar, y la secuencia
de la sonda es cualquiera de entre los Id. de Sec. N°: 42 o
la complementaria de la misma, Id. de Sec. N°: 43 o la com-
plementaria de la misma, e Id. de Sec. N°: 44 o la comple-
25 mentaria de la misma.

Un octavo aspecto de la descripción está relacionada
con otra sonda para la detección de un ácido nucleico del
VIH-1 o del VIH-2. La sonda inventada incluye una secuencia

sonda que consiste en una secuencia de bases complementaria a la diana, y opcionalmente una o más secuencias de bases que no son complementarias a los ácidos nucleicos que se desea detectar. La secuencia de bases complementaria a la
5 diana puede ser cualquiera de los Id. de Sec. N°: 23-36.

Definiciones

Los siguientes términos tienen el siguiente significado a lo largo de esta descripción, a no ser que se indique específicamente lo contrario en el texto.

10 Como se utiliza aquí, una "muestra biológica" es cualquier tejido o material que contiene polinucleótidos, obtenido a partir de una muestra humana, animal o ambiental. Las muestras biológicas de acuerdo con la invención incluyen la sangre periférica, plasma, suero u otros fluidos
15 corporales, médula ósea u otros órganos, tejidos biopsiados u otros materiales de origen biológico. Una muestra biológica puede tratarse para destruir el tejido o la estructura celular, liberando así los componentes intracelulares a una solución que puede contener enzimas, tampones, sales, de-
20 tergentes y similares.

Como se utiliza aquí, "polinucleótido" significa RNA o DNA, junto con cualquier análogo de nucleótido sintético u otras moléculas que puedan estar presentes en la secuencia y que no eviten la hibridación del polinucleótido con una
25 segunda molécula con una secuencia complementaria.

Como se utiliza aquí, una "señal detectable" es una especie química que puede detectarse o puede dar lugar a una respuesta detectable. Las señales detectables de acuer-

do con la invención pueden unirse a la sonda de polinucleótidos directamente o indirectamente, e incluyen los radioisótopos, enzimas, haptenos, cromóforos como los colorante o partículas que aportan un color detectable (por ejemplo, 5 cuentas de látex o partículas metálicas), compuestos luminiscentes (por ejemplo, porciones bioluminiscentes, fosforescentes o quimioluminiscentes) y compuestos fluorescentes.

Una " señal detectable homogénea" se refiere a una se-
10 ñal que puede detectarse de forma homogénea mediante la determinación de si la señal está en una sonda hibridada a una secuencia diana. Es decir, las señales detectables homogéneas pueden detectarse sin eliminar de forma física las formas hibridadas de las no hibridadas de la señal o
15 sonda marcada. Las señales detectables homogéneas son preferibles cuando se utiliza una sonda marcada para la detección de los ácidos nucleicos del VIH-1 o VIH-2. Ejemplos de señales homogéneas incluyen los marcajes fluorescentes, como los asociados con balizas moleculares, y marcajes quimioluminiscentes como los detallados por Arnold et al., en
20 la patente estadounidense N° 5.283.174; Woodhead et al., en la patente estadounidense N° 5.656.207; y Nelson et al., en la patente estadounidense N° 5.658.737. Las señales preferibles para su utilización en ensayos homogéneos incluyen
25 los compuestos quimioluminiscentes (por ejemplo, véase Woodhead et al., patente estadounidense N° 5.656.207; Nelson et al., patente estadounidense N° 5.658.737; y Arnold, Jr., et al., patente estadounidense N° 5.639.604). Los mar-

cajes quimioluminiscentes preferibles son los compuestos éster de acridinio ("AE"), como el AE estándar o los derivados del mismo (por ejemplo, naftil-AE, orto-AE, 1- o 3-metil-AE, 2,7-dimetil-AE, 4,5-dimetil-AE, orto-dibromo-AE, orto-dimetil-AE, meta-dimetil-AE, orto-metoxi-AE, orto-metoxi(cinamil)-AE, orto-metil-AE, orto-fluoro-AE, 1- o 3-metil-orto-fluoro-AE, 1- o 3-metil-meta-difluoro-AE, y 2-metil-AE).

Un "ensayo homogéneo" se refiere a un procedimiento de detección que no necesita una separación física de la sonda hibridada de la sonda no hibridada previamente a la determinación de la extensión de la hibridación de la sonda específica. Ensayos homogéneos de ejemplo, como los descritos aquí, pueden utilizar balizas moleculares u otras sondas auto-reveladoras que emiten señales fluorescentes cuando hibridan con una diana apropiada, marcajes de éster de acridinio quimioluminiscentes que pueden destruirse de forma selectiva mediante agentes químicos excepto en el caso de que esté presente en un dúplex de hibridación, y otras señales detectables de forma homogénea que serán familiares para los expertos en la materia.

Como se utiliza aquí, "amplificación" se refiere a un procedimiento *in vitro* para obtener múltiples copias de una secuencia de ácidos nucleicos diana, su complementaria o fragmentos de la misma.

Por "ácido nucleico diana" o "diana" se entiende un ácido nucleico que contiene una secuencia de ácidos nucleicos diana. En general, una secuencia de ácidos nucleicos

diana que se desea amplificar se posicionará entre dos cebadores dispuestos de forma opuesta, e incluirá la porción de los ácidos nucleicos diana que es totalmente complementaria a cada uno de los cebadores.

5 Por "secuencia de ácidos nucleicos diana" o "secuencia diana" o "región diana" se entiende una secuencia de desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos específica que comprende la totalidad o parte de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácidos nucleicos de cadena sencilla, y
10 la secuencia de desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos complementaria de ésta.

 Por "amplificación asociada a la transcripción " se entiende cualquier tipo de amplificación de ácidos nucleicos que utiliza una de polimerasa de RNA para producir múltiples transcritos de RNA a partir de un ácido nucleico molde. Un ejemplo de un método de amplificación asociada a la transcripción, denominada "amplificación mediada por transcripción" (TMA), generalmente utiliza una polimerasa de RNA, una polimerasa de DNA, desoxiribonucleósidos trifosfato, ribonucleósidos trifosfato y un oligonucleótido complementario del promotor-molde, y opcionalmente puede incluir uno o más oligonucleótidos análogos. Las variaciones de la TMA son bien conocidas en la materia como se describe en detalle en Burg et al., patente estadounidense N°
15 5.437.990; Kacian et al., patentes estadounidenses N° 5.399.491 y 5.554.516; Kacian et al., PCT N° WO 93/22461; Gingeras et al., PCT N° WO 88/01302; Gingeras et al., PCT N° WO 88/10315; Malek et al., patente estadounidense N°
20 5.437.990; Kacian et al., patentes estadounidenses N° 5.399.491 y 5.554.516; Kacian et al., PCT N° WO 93/22461; Gingeras et al., PCT N° WO 88/01302; Gingeras et al., PCT N° WO 88/10315; Malek et al., patente estadounidense N°
25 5.437.990; Kacian et al., patentes estadounidenses N° 5.399.491 y 5.554.516; Kacian et al., PCT N° WO 93/22461; Gingeras et al., PCT N° WO 88/01302; Gingeras et al., PCT N° WO 88/10315; Malek et al., patente estadounidense N°

5.130.238; Urdea et al., patentes estadounidenses N° 4.868.105 y 5.124.246; McDonough et al., PCT N° WO 94/03472; y Ryder et al., PCT N° WO 95/03430. Los métodos de Kacian et al. son preferibles para realizar los procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos del tipo que se describen aquí.

Como se utiliza aquí, un "oligonucleótido" u "oligómero" es una cadena polimérica de al menos dos, generalmente entre alrededor de 5 y 100, subunidades químicas, en la que cada subunidad comprende una porción base de nucleótido, una porción azúcar, y una porción de unión que liga las subunidades en una configuración espacial lineal. Las porciones base de nucleótido comunes son la guanina (G), adenina (A), citosina (C), timina (T) y uracilo (U), aunque otras bases de nucleótido raras o modificadas que son capaces de establecer puentes de hidrógeno son bien conocidas para los expertos en la materia. Los oligonucleótidos pueden incluir opcionalmente análogos de cualquiera de las porciones azúcar, las porciones base y los constituyentes del armazón. Los oligonucleótidos preferibles de la presente invención tienen un rango de longitud de entre alrededor de 10 y alrededor de 100 residuos. Los oligonucleótidos pueden purificarse a partir de fuentes naturales, pero preferiblemente se sintetizan utilizando cualquiera de entre una variedad de métodos enzimáticos o químicos bien conocidos.

Como se utiliza aquí, una "sonda" es un oligonucleótido que hibrida específicamente con una secuencia diana en

un ácido nucleico, preferiblemente en un ácido nucleico amplificado, bajo condiciones que promueven la hibridación, para formar un híbrido detectable. Una sonda puede contener opcionalmente una porción detectable que puede estar unida

5 a los extremos de la sonda o puede ser interna. Los nucleótidos de la sonda que se combinan con el polinucleótido diana no necesariamente son estrictamente contiguos, como puede ser el caso con una porción interna detectable con la secuencia de la sonda. La detección puede ser directa (es

10 decir, resultante de una sonda que hibrida directamente con la secuencia diana o ácido nucleico amplificado) o indirecta (es decir, resultante de una sonda que hibrida con una estructura molecular intermedia que une la sonda a la secuencia diana o ácido nucleico amplificado). La "diana" de

15 una sonda generalmente se refiere a una secuencia contenida en una secuencia de ácidos nucleicos amplificada que hibrida específicamente con al menos una porción de un oligonucleótido sonda utilizando puentes de hidrógeno estándar (es decir, emparejamiento de bases). Una sonda puede comprender

20 secuencias específicas de la diana y opcionalmente otras secuencias que no son complementarias a la secuencia diana que se desea detectar. Estas secuencias no complementarias pueden comprender una secuencia promotor, un punto de reconocimiento de una endonucleasa de restricción, o secuencias

25 que contribuyen a la conformación tridimensional de la sonda (por ejemplo, como se describe en Lizardi et al., patentes estadounidense N° 5.118.801 y 5.312.728). Las secuencias que son "suficientemente complementarias" permiten una

hibridación estable de un oligonucleótido sonda a una secuencia diana que no es completamente complementaria a la secuencia específica de la diana de la sonda.

Como se utiliza aquí, un "cebador de amplificación" es un oligonucleótido que hibrida con un ácido nucleico diana, o su complementaria, y participa en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, los cebadores de amplificación, o simplemente "cebadores", pueden ser oligonucleótidos opcionalmente modificados que pueden hibridar con un ácido nucleico molde y pueden tener un extremo 3' que puede ser extendido por una actividad de polimerasa de DNA. En general, un cebador tendrá una secuencia río abajo que hibrida con un ácido nucleico diana, y opcionalmente una secuencia río arriba que no es complementaria del ácido nucleico diana. La secuencia río arriba opcional puede servir, por ejemplo, como promotor de la polimerasa de RNA o contener lugares de escisión para endonucleasas de restricción.

Como se utiliza aquí, y en referencia al oligonucleótido sonda o cebador, el término "con reactividad cruzada" o variantes del mismo significa que la sonda o los cebadores no son estrictamente específicos de una única especie de polinucleótido diana. Una sonda que hibrida con los ácidos nucleicos del VIH-1 pero no con los ácidos nucleicos del VIH-2 no puede decirse que posea reactividad cruzada. Por el contrario, una sonda que puede hibridar tanto con los ácidos nucleicos diana del VIH-1 como del VIH-2 para formar complejos de hibridación detectables se consideraría

"con reactividad cruzada". De forma similar, los cebadores con reactividad cruzada pueden participar en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos utilizando los ácidos nucleicos del VIH-1 o del VIH-2 como moldes, lo que resulta
5 en la síntesis de amplicones del VIH-1 y amplicones del VIH-2.

Por "sustancialmente homólogo", "sustancialmente correspondiente" o "sustancialmente corresponde" se entiende que el oligonucleótido sujeto posee una secuencia de bases
10 que contiene una región de al menos 10 bases contiguas que es homóloga al menos en un 70%, preferiblemente homóloga al menos en un 80%, más preferiblemente homóloga al menos en un 90%, y más preferiblemente homóloga al menos en un 100% a una región de al menos 10 bases contiguas presente en una
15 secuencia de bases de referencia (lo que excluye los equivalentes de RNA y DNA). Los expertos en la materia apreciarán rápidamente que pueden realizarse modificaciones en las condiciones del ensayo de hibridación a varios porcentajes de homología para permitir la hibridación del oligonucleó-
20 tido a la secuencia diana, evitando niveles inaceptables de hibridación no específica. El grado de similitud se determina comparando el orden de las bases nucleotídicas que componen las dos secuencias y no se toma en consideración otras diferencias estructurales que puedan existir entre
25 las dos secuencias, ya que las diferencias estructurales no evitan la formación de enlaces de hidrógeno con bases complementarias. El grado de homología entre dos secuencias también puede expresarse en términos del número de desempa-

rejamientos de bases presentes en cada grupo de al menos 10 bases contiguas que se comparan, que pueden estar en el rango de entre 0-2 diferencias de bases.

Por "sustancialmente complementaria" se entiende que
5 el oligonucleótido sujeto posee una secuencia de bases que contiene una región de al menos 10 bases contiguas que es complementaria al menos en un 70%, preferiblemente complementaria al menos en un 80%, más preferiblemente complementaria al menos en un 90%, y más preferiblemente complemen-
10 taria al 100% con una región de al menos 10 bases contiguas presente en una secuencia de ácidos nucleicos diana (excluyendo los equivalentes de RNA y DNA). (Los expertos en la materia apreciarán rápidamente que pueden realizarse modificaciones en las condiciones del ensayo de hibridación a
15 varios porcentajes de complementariedad para permitir la hibridación del oligonucleótido a la secuencia diana evitando los niveles inaceptables de hibridación no específica). El grado de complementariedad se determina comparando el orden de las bases nucleotídicas que componen las dos
20 secuencias y no toma en consideración otras diferencias estructurales que puedan existir entre las dos secuencias, ya que las diferencias estructurales no evitan la formación de puentes de hidrógeno con bases complementarias. El grado de complementariedad entre dos secuencias también puede expresarse en términos del número de desemparejamientos de bases
25 presentes en cada subgrupo de menos 10 bases contiguas a comparar, que pueden oscilar entre 0-2 desemparejamientos de bases.

Por "suficientemente complementaria" se entiende una secuencia de bases contiguas de ácidos nucleicos que puede hibridar con otra secuencia de bases mediante puentes de hidrógeno entre una serie de bases complementarias. Las se-

5 cuencias de bases complementarias pueden ser complementarias en cada posición de la secuencia de bases de un oligonucleótido utilizando el emparejamiento de bases estándar (por ejemplo, emparejamiento G:C, A:T o A:U) o pueden con-

10 tener uno o más residuos que no son complementarios utilizando la formación de puentes de hidrógeno estándar (lo que incluye los "nucleótidos abásicos"), pero en la que la secuencia de bases complementarias completa puede hibridar específicamente con otra secuencia de bases bajo las condiciones de hibridación apropiadas. Las bases contiguas son

15 complementarias preferiblemente al menos en alrededor del 80%, más preferiblemente al menos en alrededor del 90%, y más preferiblemente en alrededor del 100% a una secuencia a la que se pretende que un oligonucleótido hibride específicamente. Las condiciones de hibridación apropiadas son bien

20 conocidas para los expertos en la materia, pueden predecirse fácilmente en base a la composición de la secuencia de bases, o pueden determinarse empíricamente utilizando análisis rutinarios (por ejemplo, véase Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2^a Ed. (Cold Spring

25 Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) en los apartados 1.90-1.91, 7.37-7.57, 9.47-9.51 y 11.47-11.57 particularmente en §§ 9.50-9.51, 11.12-11.13, 11.45-11.47 y 11.55-11.57).

Por "oligonucleótido de captura" se entiende al menos un oligonucleótido de ácido nucleico que proporciona un medio de unión específica a la secuencia diana y un oligonucleótido inmovilizado debido a la hibridación de pares de bases. Un oligonucleótido de captura preferiblemente incluye dos regiones de unión: una región de unión a la secuencia diana y una región de unión a la sonda inmovilizada, normalmente contiguas en el mismo oligonucleótido, aunque el oligonucleótido de captura puede incluir una región de unión a la secuencia diana y una región de unión a la sonda inmovilizada que estén presentes en dos oligonucleótidos diferentes unidos por uno o más enlazantes. Por ejemplo, una región de unión a la sonda inmovilizada puede estar presente en un primer oligonucleótido, la región de unión a la secuencia diana puede estar presente en un segundo oligonucleótido, y los dos oligonucleótidos diferentes están unidos por la formación de puentes de hidrógeno con un enlazante que es un tercer oligonucleótido que contiene secuencias que hibridan específicamente con las secuencias del primer y segundo oligonucleótidos.

Por "sonda inmovilizada" o "ácido nucleico inmovilizado" se entiende un ácido nucleico que se une, directamente o indirectamente, a un oligonucleótido de captura en un soporte inmovilizado. Una sonda inmovilizada es un oligonucleótido unido a un soporte sólido que facilita la separación de la secuencia diana unida del material no unido en una muestra.

Por "separar" o "purificar" se entiende que uno o más

componentes de la muestra biológica se eliminan de entre uno o más componentes distintos de la muestra. Los componentes de la muestra incluyen a ácidos nucleicos en una fase de solución generalmente acuosa que también puede incluir materiales como proteínas, carbohidratos, lípidos y sondas marcadas. Preferiblemente, el paso de separación o purificación elimina al menos un 70%, más preferiblemente al menos un 90% y, incluso más preferiblemente, al menos un 95% del resto de componentes presentes en la muestra.

10 Por "equivalentes de RNA y DNA" o "bases equivalentes de RNA y DNA" se entienden moléculas, como el RNA y el DNA, con las mismas propiedades de hibridación de pares de bases complementarias. Los equivalentes de RNA y DNA poseen diferentes porciones azúcar (es decir, ribosa frente a desoxi-
15 ribosa) y pueden diferir por la presencia de uracilo en el RNA y de timina en el DNA. Las diferencias entre los equivalentes de RNA y DNA no contribuyen a las diferencias en la homología ya que los equivalentes tienen el mismo grado de complementariedad con una secuencia particular.

20 Por "consiste esencialmente en" se entiende que el(los) componente(s) adicional(es), composición(es) o paso(s) del método que no cambian de forma sustancialmente las características básicas y novedosas de la presente descripción pueden incluirse en las composiciones, equipos o
25 métodos. Tales características incluyen la capacidad de detectar de forma selectiva los ácidos nucleicos del VIH-1, del VIH-2 o la combinación de VIH-1 y VIH-2 en muestras biológicas como sangre total o plasma. Cualquier componen-

te(s), composición(es) o paso(s) del método que tengan un efecto sustancial en las características básicas y novedosas de la presente descripción quedaría fuera de este término.

5 **Breve descripción de la figuras**

La Figura 1 es un diagrama esquemático que ilustra varios polinucleótidos que pueden utilizarse para la detección de una región diana en los ácidos nucleicos de VIH-1 o VIH-2 (representada por una línea gruesa horizontal). Las
10 posiciones de los siguientes ácidos nucleicos se indican en relación a la región diana: "oligonucleótido de captura" se refiere a ácidos nucleicos utilizados para hibridar y capturar los ácidos nucleicos diana previamente a la amplificación, en el que "T" se refiere a una secuencia cola utiliza
15 para hibridar con un oligonucleótido inmovilizado con una secuencia complementaria (no se muestra); "Cebador no T7" y "cebador-promotor T7" representan dos cebadores de amplificación utilizados para iniciar la TMA, en los que "P" indica la secuencia promotor del cebador-promotor T7; y
20 "sonda" se refiere a la sonda utilizada para la detección del ácido nucleico amplificado.

Descripción detallada de la invención

Aquí se describen las composiciones, métodos y equipos para la detección de los ácidos nucleicos del VIH-1, del
25 VIH-2, o de una combinación de VIH-1 y VIH-2 en las muestras biológicas como la sangre, suero, plasma u otros fluidos o tejidos corporales. Las sondas, cebadores y métodos de la invención pueden utilizarse en aplicaciones diagnós-

ticas o para el cribado de las donaciones de sangre y productos sanguíneos u otros tejidos que pueden contener partículas infecciosas.

Introducción y visión general

5 La presente invención incluye composiciones (es decir, oligonucleótidos de amplificación o cebadores, y sondas), métodos y equipos que son particularmente útiles para la detección de los ácidos nucleicos del VIH-1, VIH-2, o de una combinación de VIH-1 y VIH-2 en una muestra biológica.

10 Para diseñar secuencias oligonucleótido apropiadas para tal utilización, las secuencias conocidas de los ácidos nucleicos del VIH-1 y VIH-2 se compararon en primer lugar para identificar regiones candidatas de los genomas virales que pudieran servir como reactivos en un ensayo diagnóstico.

15 Como resultado de estas comparaciones, se seleccionaron secuencias particulares y se analizaron como dianas de detección utilizando el oligonucleótido de capturas, los cebadores y la sonda que se muestran esquemáticamente en la Figura 1. Las porciones de secuencias que contienen relativamente pocas variantes se escogieron como puntos de partida

20 para diseñar oligonucleótidos sintéticos adecuados para su utilización en la captura, amplificación y detección de las secuencias amplificadas.

 En base a estos análisis, se diseñaron las secuencias

25 del cebador de amplificación y de la sonda que se presentan a continuación. Los expertos en la materia apreciarán que cualquier secuencia de cebador específico para el VIH-1, VIH-2, o una combinación de dianas del VIH-1 y VIH-2, con o

sin una secuencia del promotor T7, puede utilizarse como cebador en los diferentes métodos de amplificación *in vitro* basados en cebadores descritos a continuación. También se contempla que los oligonucleótidos con las secuencias aquí
5 descritas pueden tener funciones alternativas en ensayos para la detección de los ácidos nucleicos del VIH-1 y/o VIH-2. Por ejemplo, los oligonucleótidos de captura aquí descritos pueden utilizarse como sondas de hibridación, la sonda de hibridación aquí descrita puede utilizarse como
10 cebadores de amplificación, y los cebadores de amplificación aquí descritos pueden utilizarse como sonda de hibridación en ensayos de detección alternativos.

Los cebadores de amplificación aquí descritos se contemplan concretamente como componentes de reacciones de amplificación multiplex en las que pueden obtenerse varias
15 especies de amplicón a partir de una selección de cebadores específicos de la diana. Por ejemplo, se contempla que ciertos cebadores preferibles aquí descritos pueden utilizarse en reacciones de amplificación multiplex que pueden
20 amplificar polinucleótidos de virus no relacionados sin comprometer de forma sustancial la sensibilidad de estos ensayos. Ejemplos particulares de estos virus no relacionados incluyen el VHC y VHB.

Métodos de amplificación de utilidad

25 Los métodos de amplificación de utilidad en relación con la presente invención incluyen: la amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación de ácidos nucleicos basada en la secuencia (NASBA), reacción en cadena de

la polimerasa (PCR), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), y métodos de amplificación que utilizan moléculas polinucleotídicas auto-replicativas y enzimas de replicación como el RNA del MDV-1 y la enzima Q-beta. Los métodos para realizar todas estas técnicas de amplificación pueden encontrarse respectivamente en la patente estadounidense N° 5.399.491, solicitud de patente europea publicada PE 0.525.882, patente estadounidense N° 4.965.188, patente estadounidense N° 5.455.166, patente estadounidense N° 5.472.840 y en Lizardi et al., BioTechnology 6:1197 (1988).

En una realización altamente preferible de la invención, las secuencias de ácido nucleico analito se amplifican utilizando un protocolo de TMA. De acuerdo con este protocolo, la transcriptasa reversa que proporciona la actividad polimerasa de DNA también posee una actividad endógena RNasa H. Uno de los cebadores utilizados en este procedimiento contiene una secuencia promotor posicionada río arriba de una secuencia que es complementaria de una cadena de los ácidos nucleicos diana que se desea amplificar. En el primer paso de la amplificación, un promotor-cebador hibrida con el RNA diana en un lugar definido. La transcriptasa reversa crea una copia de DNA complementaria del RNA diana mediante la extensión a partir del extremo 3' del promotor-cebador. Tras la interacción de un cebador de la cadena opuesta con la cadena de DNA recién sintetizada, se sintetiza una segunda cadena de DNA a partir del extremo del cebador mediante la transcriptasa reversa, creando así una molécula de DNA de doble cadena. La polimerasa de RNA

reconoce la secuencia promotor en este molde de DNA de doble cadena e inicia la transcripción. Cada uno de los amplicones de RNA recién sintetizados entra de nuevo en el proceso de TMA y sirve como molde para un nuevo ciclo de replicación, dando lugar así a una expansión exponencial del amplicón de RNA. Ya que cada uno de los moldes de DNA puede generar 100-1000 copias del amplicón de RNA, esta expansión puede resultar en la producción de 10 billones de amplicones en menos de una hora. El proceso completo es autocatalítico y se realiza a temperatura constante.

Características estructurales de los cebadores

Como se ha indicado anteriormente, un "cebador" se refiere a un oligonucleótido opcionalmente modificado que puede participar en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos. Los cebadores altamente preferibles pueden hibridar con un ácido nucleico molde y poseen un extremo 3' que puede extenderse mediante una actividad polimerasa de DNA. La región 5' del cebador puede no ser complementaria del ácido nucleico diana. Si la región 5' no complementaria incluye una secuencia promotor, se denomina "promotor-cebador". Los expertos en la materia apreciarán que cualquier oligonucleótido que pueda funcionar como cebador (es decir, un oligonucleótido que hibride específicamente con una secuencia diana y posea un extremo 3' que pueda extenderse mediante una actividad polimerasa de DNA) puede modificarse para que incluya una secuencia promotor en 5', y así poder funcionar como un promotor-cebador. De forma similar, cualquier promotor-cebador puede modificarse median-

te la eliminación de una secuencia promotor, o la síntesis sin ésta, y seguir funcionando como cebador.

Las porciones base de los nucleótidos de los cebadores pueden modificarse (por ejemplo, mediante la adición de grupos propina), siempre que la porción base modificada mantenga la capacidad de formar una asociación no covalente con G, A, C, T o U, y siempre que un oligonucleótido que comprenda al menos una porción base de nucleótido modificada o un análogo no evite de forma estérica la hibridación con un ácido nucleico de cadena sencilla. Como se indica a continuación en relación con la composición química de las sondas útiles, las bases nitrogenadas de los cebadores de acuerdo con la invención pueden ser bases convencionales (A, G, C, T, U), análogos conocidos de las mismas (por ejemplo, inosina o "I" con hipoxantina como porción base; véase *The Biochemistry of Nucleic Acids* 5-36, Adams et al., Ed., 11^a Ed., 1992), derivados conocidos de bases purina o pirimidina (por ejemplo, N⁴-metildesoxigaunosina, deaza- o aza-purinas y deaza- o aza-pirimidinas, bases pirimidina con grupos sustituyentes en la posición 5 o 6, bases purina con un sustituyente alterado o reemplazado en las posiciones 2, 6 o 8, 2-amino-6-metilaminopurina, 0⁶-metilguanina, 4-tio-pirimidinas, 4-amino-pirimidinas, 4-dimetilhidrazin-pirimidinas y 0⁴-alquil-pirimidinas (véase, Cook, Pub. Int'1 PCT N° WO 93/13121) y residuos "abásicos" en los que el esqueleto de la molécula no incluye bases nitrogenada en uno o más residuos del polímero (véase Arnold et al., patente estadounidense N° 5.585.481). Las porciones azúcar comunes

que comprenden el esqueleto de cebador incluyen la ribosa y desoxiribosa, aunque también pueden utilizarse 2'-O-metilribosa (OMe), azúcares halogenados, y otras porciones azúcar modificadas. Normalmente, el grupo de unión del esqueleto del cebador es una porción que contiene fósforo, más comúnmente una unión fosfodiéster, aunque otras uniones, como por ejemplo, fosforotioatos, metilfosfonatos, y uniones que no contienen fósforo como las uniones de tipo peptídico que se encuentran en los "ácidos nucleicos peptídicos" (PNA) también pueden utilizarse en el ensayo que aquí se describe.

Sistemas de marcaje de la sonda y porciones detectables de utilidad

Esencialmente cualquier sistema de marcaje y detección que pueda utilizarse para monitorizar la hibridación específica de ácidos nucleicos puede utilizarse en la presente invención. Se incluyen entre los diversos marcajes útiles los radiomarcajes, enzimas, haptenos, oligonucleótidos enlazados, moléculas quimioluminiscentes, porciones fluorescentes (solas o en combinación con porciones "bloqueadoras"), y porciones activas redox que adecuadas para los métodos de detección electrónicos. Las moléculas quimioluminiscentes preferibles incluyen los ésteres de acridinio del tipo descrito por Arnold et al., en la patente estadounidense N° 5.283.174 para su utilización en ensayos de protección homogéneos, y del tipo descrito por Woodhead et al., en la patente estadounidense N° 5.656.207 para su utilización en ensayos que cuantifican dianas múltiples en una

única reacción. Las aproximaciones de marcaje y detección electrónica preferibles se describen en las patentes estadounidenses N° 5.591.578 y 5.770.369, y la solicitud de patente internacional publicada WO 98/57158. Las porciones
5 activas rédox útiles como marcajes en la presente invención incluyen los metales de transición como Cd, Mg, Cu, Co, Pd, Zn, Fe y Ru.

Las señales detectables particularmente preferibles para la sonda de acuerdo con la presente invención son detectables en sistemas de ensayo homogéneos (es decir, en
10 los que, en una mezcla, la sonda marcada unida muestra un cambio detectable, como estabilidad o degradación diferencial, comparado con la sonda marcada no unida). Aunque otras señales detectables de forma homogénea, como los marcajes fluorescentes y señales detectables electrónicamente,
15 son útiles para su utilización en la práctica de la presente invención, una señal preferible para su utilización en ensayos homogéneos es un compuesto quimioluminiscente (por ejemplo, como el descrito por Woodhead et al., en la patente estadounidense N° 5.656.207; por Nelson et al., en la
20 patente estadounidense N° 5.658.737; o por Arnold et al., en la patente estadounidense N° 5.639.604). Las señales quimioluminiscentes particularmente preferibles incluyen los compuestos con ésteres de acridinio ("AE"), como el AE
25 estándar o derivados del mismo, como naftil-AE, orto-AE, 1- o 3-metil-AE, 2,7-dimetil-AE, 4,5-dimetil-AE, ortodibromo-AE, orto-dimetil-AE, meta-dimetil-AE, orto-metoxi-AE, orto-metoxi(cinamil)-AE, orto-metil-AE, orto-fluoro-AE, 1- o 3-

metil-orto-fluoro-AE, 1- o 3-metil-meta-difluoro-AE y 2-metil-AE.

En algunas aplicaciones, son deseables sondas que muestran al menos cierto grado de auto-complementariedad para facilitar la detección de los dúplex sonda:diana en una muestra de ensayo sin que sea necesaria la eliminación de sonda no hibridada previamente a la detección. Como ejemplo, las estructuras denominadas "antorchas moleculares" están diseñadas para incluir distintas regiones de auto-complementariedad (denominadas "dominio de unión a la diana" y "dominio de cierre de la diana" que están conectados mediante una región de unión y que hibridan entre ellos bajo condiciones predeterminadas del ensayo de hibridación. Cuando se exponen a condiciones desnaturalizantes, las dos regiones complementarias (que pueden ser total o parcialmente complementarias) de la antorcha molecular desnaturalizada, deja el dominio de unión a la diana disponible para la hibridación con la secuencia diana cuando se restauran las condiciones predeterminadas del ensayo de hibridación.

Las antorchas moleculares se diseñan de forma que el dominio de unión a la diana favorece la hibridación a la secuencia diana sobre el dominio de cierre de la diana. El dominio de unión a la diana y el dominio de cierre de la diana de una antorcha molecular incluyen marcajes que interactúan (por ejemplo, fluorescente/ bloqueador) posicionados de forma que se produce una señal diferente cuando la antorcha molecular está auto-hibridada de la que se produce cuando la antorcha molecular está hibridada con un

ácido nucleico diana, permitiendo así la detección de los dúplex sonda:diana en una muestra de ensayo en presencia de sonda no hibridada con una señal viable asociada con ella. Las antorchas moleculares se describen de forma más completa en la patente estadounidense N° 6.361.945.

Otro ejemplo de sonda auto-complementaria en un ensayo de hibridación que puede utilizarse en la invención es una estructura que comúnmente se denomina "baliza molecular". Las balizas moleculares comprenden moléculas de ácido nucleico con una secuencia complementaria de la diana, un par de afinidad (o brazos de ácido nucleico) que mantienen la sonda en una conformación cerrada en ausencia de una secuencia de ácidos nucleicos diana, y un par de señal que interactúa cuando la sonda está en conformación cerrada. La hibridación de los ácidos nucleicos diana y la secuencia complementaria de la diana separa los miembros del par de afinidad, cambiando así la conformación de la sonda a una posición abierta. El cambio a conformación abierta se puede detectar debido a la reducción de la interacción del par de señal, que puede ser, por ejemplo, un fluoróforo y un bloqueador (por ejemplo, DABCYL y EDANS). Las balizas moleculares se describen detalladamente en la patente estadounidense N° 5.925.517. Pueden crearse balizas moleculares útiles para la detección específica de secuencias de ácidos nucleicos añadiendo a cada uno de los extremos de una de las secuencias sonda aquí descritas, un primer brazo de ácidos nucleicos que comprenda un fluoróforo y un segundo brazo de ácidos nucleicos que comprenda una porción blo-

queador. En esta configuración, la secuencia sonda aquí descrita sirve como porción "bucle" complementaria de la diana de la baliza molecular resultante.

Las balizas moleculares preferiblemente están marcadas
5 con un par interactivo de señales detectables. Los ejemplos de señales detectables que son preferibles como miembros de un par interactivo de señales interaccionan entre ellas mediante mecanismos de transferencia de energía FRET o no FRET. La transferencia de energía por resonancia de la
10 fluorescencia (FRET) involucra la transmisión sin radiación de cuantos de energía desde el punto de absorción al punto de su utilización en la molécula o sistema de moléculas, mediante la interacción de la resonancia entre cromóforos, a lo largo de distancias considerablemente mayores a las
15 distancias interatómicas, sin conversión a energía térmica, y sin que el donador y el aceptor sufran una colisión cinética. El "donador" es la porción que absorbe inicialmente la energía, y el "aceptor" es la porción a la que la energía se transfiere a continuación. Además del FRET, existen
20 al menos otros tres procesos de transferencia de energía "no FRET" mediante los que la energía de excitación puede transferirse desde una molécula donadora a una aceptora.

Cuando dos señales se mantienen lo suficientemente cercanas para que la energía emitida por una señal pueda
25 ser recibida o absorbida por una segunda señal, ya sea por un mecanismo FRET o no FRET, se dice que las dos señales están en "relación de transferencia de energía" entre ellas. Éste es el caso, por ejemplo, cuando una baliza mo-

lecular se mantiene en estado cerrado mediante la formación de un dúplex original, y la emisión de fluorescencia desde un fluoróforo unido a un brazo de la sonda está bloqueado por una porción bloqueadora en el brazo contrario.

5 Las porciones señal altamente preferibles para las balizas moleculares incluyen un fluoróforo y una segunda porción con propiedades de bloqueo de la fluorescencia (es decir, un "bloqueador"). En esta realización, la señal característica es probablemente la fluorescencia de una longitud
10 de una particular, pero alternativamente podría ser una señal de luz visible. Cuando está involucrada la fluorescencia, los cambios en la emisión se deben preferiblemente a FRET, o a modos de transferencia de energía radiativa o no FRET. Cuando una baliza molecular con un par de señales in-
15 teractivas en estado cerrado se estimula mediante una frecuencia de luz apropiada, se genera una señal fluorescente en un primer nivel, que puede ser muy bajo. Cuando esta misma sonda está en estado abierto y se estimula mediante una frecuencia de luz apropiada, las porciones fluoróforo y
20 bloqueador están lo suficientemente separadas entre ellas para que la transferencia de energía entre ellas se elimine sustancialmente. Bajo tales condiciones, la porción bloqueador no puede bloquear la fluorescencia de la porción fluoróforo. Si el fluoróforo se estimula mediante energía
25 lumínica de una longitud de onda apropiada, se generará una señal fluorescente de un segundo nivel, mayor que el primer nivel. La diferencia entre los dos niveles de fluorescencia es detectable y medible. Utilizando las porciones fluorófo-

ro y bloqueador de este modo, la baliza molecular solo está "activa" en la conformación "abierta" e indica que la sonda está unida a la diana emitiendo una señal fácilmente detectable. El estado conformacional de la sonda altera la señal generada a partir de la sonda regulando la interacción entre las porciones de la señal.

Ejemplos de pares de señal donador/ aceptor que pueden utilizarse en la invención, sin que se pretenda distinguir los pares FRET de los no FRET, incluyen los colorantes fluoresceína/ tetrametilrodamina, IAEDANS/ fluoresceína, EDANS/ DABCYL, cumarina/ DABCYL, fluoresceína/ fluoresceína, BODIPY FL/ BODIPY FL, fluoresceína/ DABCYL, amarillo lucifer/ DABCYL, BODIPY/ DABCYL, eosina/ DABCYL, eritrosina/ DABCYL, tetrametilrodamina/ DABCYL, rojo Texas/ DABCYL, CY5/ BH1, CY5/ BH2, CY3/ BH1, CY3/ BH2 y fluoresceína/ QSY7. Los expertos en la materia comprenderán que cuando los colorantes donador y aceptor son diferentes, la transferencia de energía puede detectarse por la aparición de fluorescencia sensibilizada del aceptor o mediante el bloqueo de la fluorescencia del donador. Cuando las especies donador y aceptor son la misma, puede detectarse energía mediante la despolarización de la fluorescencia resultante. Los aceptores no fluorescentes como los colorante DABCYL y QSY 7 eliminan de forma ventajosa el potencial problema de la fluorescencia de fondo resultante de la excitación directa (es decir, no sensibilizada) del aceptor. Las porciones fluoróforo preferibles que pueden utilizarse como uno de los miembros del par donador-aceptor incluyen los coloran-

tes fluoresceína, ROX y CY (como CY5). Las porciones bloqueador altamente preferibles que pueden utilizarse como el otro miembro de un par donador-aceptor incluyen las porciones DABCYL y BLACK HOLE QUENCHER disponibles en Biosearch Technologies, Inc., (Novato, CA).

Las técnicas y métodos sintéticos de unión de señales a los ácidos nucleicos y detección de señales son bien conocidas en la materia (por ejemplo, véanse Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), Capítulo 10; Nelson et al., patente estadounidense Nº 5.658.737; Woodhead et al., patente estadounidense Nº 5.656.207; Hogan et al., patente estadounidense Nº 5.547.842; Arnold et al., patente estadounidense Nº 5.283.174; Kourilsky et al., patente estadounidense Nº 4.581.333), y Becker et al., patente estadounidense Nº 0.747.706.

Composición química de las sondas

Las sondas de acuerdo con la invención comprenden polinucleótidos o análogos de polinucleótido y opcionalmente pueden llevar una señal detectable covalentemente unida a ella. Los nucleósidos o análogos de nucleósido de la sonda comprenden bases heterocíclicas nitrogenadas, o análogos de base, en la que los nucleósidos están unidos juntos, por ejemplo mediante enlaces fosfodiéster para formar un polinucleótido. De acuerdo con esto, una sonda puede comprender ácidos ribonucleicos (RNA) convencionales y/o ácidos desoxiribonucleicos (DNA), pero también pueden comprender

análogos químicos de estas moléculas. El "armazón" de una sonda puede estar constituido de una serie de enlaces conocidos en la materia, lo que incluye uno o más enlaces azúcar-fosfodiéster, puentes péptido-ácidos nucleicos (algunas veces referidos como "ácidos nucleicos peptídicos" tal como se describe en Hyldig-Nielsen et al., Pub. Int. PCT N° WO 95/32305), enlaces fosforotioato, enlaces metilfosfonato o combinaciones de los mismos. Las porciones de azúcar de la sonda pueden ser ribosa o desoxiribosa, o compuestos similares con sustituciones conocidas, como, por ejemplo, sustituciones 2'-O-metilribosa y 2' haluro (por ejemplo, 2'-F). Las bases nitrogenadas pueden ser bases convencionales (A, G, C, T, U), análogos conocidos de las mismas (por ejemplo, inosina o "I"; véase "The Biochemistry of the Nucleic Acids" 5-36, Adams et al., ed., 11ª Ed., 1992), los derivados conocidos de las bases púricas o pirimidínicas (por ejemplo, N⁴-metil desoxiguanosina, deaza- o aza-purinas y deaza- o aza-pirimidinas, las bases pirimidínicas con grupos sustituyentes en la posición 5 o 6, las bases púricas con un sustituyente alterado o reemplazado en las posiciones 2, 6 o 8, 2-amino-6-metilaminopurina, 06-metilguanina, 4-tio-pirimidinas, 4-amino-pirimidinas, 4-dimetilhidrazina-pirimidinas, y 04-alquil-pirimidinas (véase, Cook, Pub. Int. PCT N° WO 93/13121) y residuos "abásicos" en los que el armazón no incluye base nitrogenada para uno o más residuos del polímero (véase Arnold et al., Patente Estadounidense N° 5.585.481). Una sonda puede comprender sólo azúcares, bases y enlaces convencionales en-

contrados en el RNA y DNA, o puede incluir ambos componentes y sustituciones convencionales (por ejemplo, bases convencionales unidas mediante un armazón metoxi, o un ácido nucleico que incluye bases convencionales y uno o más análogos de base).

Mientras que puede utilizarse una sonda de oligonucleótido de diferente longitud y composición de bases para la detección de los ácidos nucleicos de VIH-1, VIH-2, o la combinación de VIH-1 y VIH-2, la sonda preferible en esta invención posee longitudes de hasta 100 nucleótidos, y más preferiblemente de hasta 60 nucleótidos. Los rangos de longitud preferibles para los oligonucleótidos de la invención están entre 10 y 100 bases de longitud, o más preferiblemente entre 15 y 50 bases de longitud, o aún más preferiblemente entre 15 y 30 bases de longitud. No obstante, las secuencias de sonda específicas descritas más adelante también pueden proporcionarse en un vector de clonación o transcrito de ácidos nucleicos u otros ácidos nucleicos más largos y aún pueden utilizarse para la detección de ácidos nucleicos diana. Así, las sondas útiles de acuerdo con la invención puede incluir una secuencia complementaria a la diana de bases con una longitud limitada, y una o más secuencias anexadas que no son complementarias a la secuencia diana que se desea detectar. Por ejemplo, una baliza molecular puede incluir un lazo de secuencia complementaria a la diana flanqueado por secuencias "brazo" que no son complementarias a la diana que se desea detectar.

Selección de cebadores de amplificación y sondas de

detección

Las guías útiles para diseñar los cebadores las sondas de amplificación y con características deseadas se describen en el presente documento. Los sitios óptimos para amplificar y sondear ácidos nucleicos de VIH-1 y/o VIH-2 contienen dos, y preferiblemente tres, regiones conservadas cada una mayor que la anterior de alrededor 10-15 bases de longitud, dentro de alrededor 200-300 bases de secuencia contigua. El grado de amplificación observado con el grupo de cebadores o promotor-cebadores depende de varios factores, lo que incluye la capacidad de los oligonucleótidos de hibridar con sus secuencias complementarias y su capacidad de extenderse enzimáticamente. Debido a la extensión y especificidad de las reacciones de hibridación están afectados por una serie de factores, la manipulación de estos factores determinará la sensibilidad exacta y especificidad de un oligonucleótido particular, que puede ser perfectamente complementario a su diana o no. Los efectos de la variación de las condiciones de ensayo son conocidos por los expertos en la materia, y se describen por Hogan et al., en la Patente Estadounidense N° 5.840.488.

La longitud de la secuencia diana de ácidos nucleicos y, concordantemente, la longitud de la secuencia de cebador o de la secuencia de la sonda puede ser importante. En algunos casos, puede haber varias secuencias a partir de una región diana particular, variando la localización y longitud, que pueden proporcionar cebadores o sondas con las características de hibridación deseadas. Mientras que es

posible hibridar los ácidos nucleicos que no son perfectamente complementarios, el tramo más largo de secuencia de base perfectamente homóloga, normalmente determinará primariamente la estabilidad del híbrido.

5 Los cebadores y la sonda de amplificación se posicionarán para minimizar la estabilidad del híbrido oligonucleótido: ácido nucleico no diana (es decir, ácidos nucleicos con secuencia similar al ácido nucleico diana). Es preferible que los cebadores de amplificación y la sonda de
10 detección sean capaces de distinguir entre secuencia diana y no diana. En el diseño de cebadores y sondas, las diferencias en estos valores de T_m serán tan amplias como sea posible (por ejemplo, al menos 2°C y preferiblemente 5 °C).

 El grado de extensión no específica (cebador-dímero o
15 copia de no diana) puede también afectar la eficiencia de amplificación. Por esta razón, los cebadores se seleccionan para tener baja autocomplementariedad o complementariedad cruzada, particularmente en los extremos 3' de la secuencia. Los tramos largos de homopolímero y de alto contenido
20 de GC se evitan para reducir la extensión de cebadores que no interesa. Existen programas de ordenador comerciales que pueden ayudar en este aspecto del diseño. Algunos de estos programas disponibles incluyen MacDNASIS™ 2.0 (Hitachi Software Engineering American Ltd.) y OLIGO ver. 6.6 (Molecular Biology Insights; Cascade, CO).
25

 Los expertos en la materia se darán cuenta que la hibridación involucra la asociación de dos cadenas sencillas de ácidos nucleicos complementarios para formar una

doble cadena unida por puentes de hidrógeno. Queda implícito que si una de las dos cadenas está totalmente o parcialmente involucrada en un híbrido, entonces esa cadena estará menos disponible para participar en la formación de un nuevo híbrido. Al diseñar los cebadores y las sondas de forma que porciones importantes de las secuencias de interés sean de cadena sencilla, la tasa y extensión de la hibridación puede verse incrementada enormemente. Si la diana es una secuencia genómica integrada, entonces aparecerá de forma natural en una doble cadena (como es el caso del producto de la reacción en cadena de la polimerasa). Estas dianas de doble cadena inhiben de forma natural la hibridación con una sonda y requiere de la desnaturalización antes del paso de hibridación.

La tasa en la que un polinucleótido hibrida a su diana es una medida de la estabilidad térmica de la estructura secundaria de diana en la región de unión a la diana. La medición estándar de la tasa de hibridación es $C_0t_{1/2}$ que se mide como moles de nucleótido por litro multiplicado por segundos. Así, es la concentración de sonda multiplicado por el tiempo en el que ocurre el 50% de hibridación máxima a esa concentración. Este valor se determina mediante la hibridación de varias cantidades de polinucleótido a una cantidad constante de diana para un tiempo fijo. La $C_0t_{1/2}$ se encuentra gráficamente mediante procedimientos estándar familiares a los expertos en la materia.

Cebadores de amplificación preferibles

Los cebadores útiles para llevar a cabo las reacciones

de amplificación pueden poseer diferentes longitudes para acomodar la presencia de secuencias extrañas que no participen en la unión de la diana, y que no afectan sustancialmente los procesos de amplificación o detección. Por ejemplo, los cebadores-promotor útiles para realizar las reacciones de amplificación de acuerdo con la invención poseen al menos una secuencia mínima que hibrida con el ácido nucleico diana, y una secuencia promotor posicionada río arriba de esta secuencia mínima. No obstante, la inserción de secuencias entre la secuencia de unión a la diana y la secuencia promotor puede cambiar la longitud del cebador sin comprometer su utilidad en la reacción de amplificación. De forma adicional, las longitudes de los cebadores de amplificación y de las sondas de detección se pueden elegir siempre que las secuencias de estos oligonucleótidos estén conformes con los requisitos mínimos esenciales para hibridar la secuencia complementaria deseada.

Las Tablas 1 y 2 presentan ejemplos específicos de secuencias de oligonucleótido que se utilizaron como cebadores para amplificar VIH-1, VIH-2, o la combinación de ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2 en la región que codifica la integrasa p31. La Tabla 1 presenta las secuencias de cebadores que son sustancialmente complementarias a una cadena de los diferentes ácidos nucleicos diana. Los ejemplos de cebadores presentados en la Tabla 1 poseen secuencias complementarias a la diana que incluye un núcleo de secuencia 17-mero de ACARYAGTACWAATGGC (Id. de Sec. N°:10) (en el que "R" representa A/G, y "W" representa A o T/U), que permite

la sustitución de hasta uno, o incluso hasta dos análogos de base. La inosina es un ejemplo de un análogo de base altamente preferible que puede utilizarse para este propósito, y la posición 5 y/o la posición 11 del núcleo de la secuencia puede sustituirse con este análogo de base con muy buenos resultados. Es preferible para uno de los cebadores utilizados en el proceso de amplificación tener una secuencia complementaria a la diana que contiene este núcleo 17-mero. El cebador puede además incluir varios nucleótidos anexados al extremo río arriba del núcleo de la secuencia, y puede incluir unos cuantos nucleótidos anexados al extremo río abajo del núcleo de la secuencia. Por ejemplo, puede tener cinco, o incluso más nucleótidos anexados al extremo corriente arriba. Es conveniente incluir uno, dos, o tres nucleótidos anexados al extremo corriente abajo, si se desea. La Tabla 2 presenta las secuencias de los cebadores complementarios a la diana y las secuencias completas de cebadores-promotor que se utilizaron durante el desarrollo de la invención. Puede destacarse, que las secuencias de oligonucleótidos en la Tabla 1 y la Tabla 2 son sustancialmente complementarias a las cadenas opuestas de los ácidos nucleicos diana a amplificar.

Los cebadores útiles para amplificar las dianas de ácidos nucleicos de VIH-1 y/o VIH-2 pueden incluir análogos de nucleótido. Por ejemplo, cuando se compara con la secuencia de cebador básica de Id. de Sec. N°:5, los cebadores con el Id. de Sec. N°:6, Id. de Sec. N°: 7 e Id. de Sec. N°:9 difieren en la presencia de un residuo de inosina

único en la posición 16, en la sustitución de un residuo T por una C en la posición 10 y un residuo de inosina en la posición 16, o sustituciones de inosina en las posiciones 10 y 16, respectivamente. Tal como se confirma mediante los hallazgos experimentales presentados aquí, estas diferencias en las bases confieren propiedades beneficiosas que no habían sido predichas antes del descubrimiento descrito aquí. Más específicamente, los resultados demuestran que uno de estos cebadores mutantes, cuando se empareja con un cebador único de la cadena opuesta, pierde la especificidad para el molde de VIH-1 y adquiere la capacidad de amplificar ambos moldes de VIH-1 y VIH-2 con casi la misma eficiencia. Esto ilustra cómo ciertas posiciones en los cebadores pueden sustituirse con bases modificadas o análogos de bases.

Tabla 1

<u>Secuencias de polinucleótido de cebadores de amplificación</u>	
Secuencia	Identificador
ACAGCAGTACAAATGGCAG	Id. de Sec. N°:1
ACAACAGTACAAATGGCAGT	Id. de Sec. N°:2
ACAATAGTACTAATGGCAGT	Id. de Sec. N°:3
TTAAGACAGCAGTACAAATGGC	Id. de Sec. N°:4
TAGAGACAGCAGTACAAATGGC	Id. de Sec. N°:5
TAGAGACAGCAGTACIAATGGC	Id. de Sec. N°:6
TAGAGACAGTAGTACIAATGGC	Id. de Sec. N°:7
TAGAGACAGCAGTACTAATGGC	Id. de Sec. N°:8
TAGAGACAGIAGTACIAATGGC	Id. de Sec. N°:9

La Tabla 2 presenta secuencias de oligonucleótido com-

plementarias a la diana y las correspondientes secuencias promotor-cebador que se usan para amplificar las secuencias de ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2. Tal como se ha indicado anteriormente, todas las secuencias cebadores-promotor
5 incluidas que son sustancialmente complementarias, es decir, que son capaces de hibridar con una secuencia diana en su extremo 3', y una secuencia promotor de T7 en su extremo 5'. Los cebadores identificados por el Id. de Sec. N°: 17-22 en la Tabla 2 son cebadores-promotor correspondientes a
10 los cebadores identificados como Id. de Sec. N°: 11-16, respectivamente. Las bases correspondientes a las secuencias del promotor T7 en la tabla están subrayados.

Tabla 2

Secuencias de polinucleótido de cebadores de amplificación		
Característica	Secuencia	Identificador
Complementario a la diana	ATTTCTTGTTCTGTGGTAATCATGTTG	Id. de Sec. N°:11
Complementario a la diana	TTGTTTTTGTAATAGTTGTATTTCTTGTTCTG	Id. de Sec. N°:12
Complementario a la diana	GTTTGTATGTCTGTTGCTATTATGTCTATTAG TCTTTCTGCTGG	Id. de Sec. N°:13
Complementario a la diana	GTTTGTATGTCTGTTGCTATCATGTTGATTAT TCTTTC	Id. de Sec. N°:14
Complementario a la diana	ATTTGTTTTTGTAATTCTTGTATTTCTATGTC TGT	Id. de Sec. N°:15
Complementario a la diana	GTTTGTATGTCTGTTGCTATTATGTCTA	Id. de Sec. N°:16
Cebador-Promotor	<u>AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAATTT</u> CTTGTTCTGTGGTAATCATGTTG	Id. de Sec.

T7		Nº:17
Cebador-Promotor T7	<u>AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGATTGT</u> TTTTGTAATAGTTGTATTTCTTGTTCTG	Id. de Sec. Nº:18
Cebador-Promotor T7	<u>AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTT</u> GTATGTCTGTTGCTATTATGTCTATTAGTCTT TCTGCTGG	Id. de Sec. Nº:19
Cebador-Promotor T7	<u>AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTT</u> GTATGTCTGTTGCTATCATGTTGATTATTCTT TC	Id. de Sec. Nº:20
Cebador-Promotor T7	<u>AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAATTT</u> GTTTTGTAATTCTTGTTATTTCTATGTCTGT	Id. de Sec. Nº:21
Cebador-Promotor T7	<u>AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTT</u> GTATGTCTGTTGCTATTATGTCTA	Id. de Sec. Nº:22

Los grupos preferibles de cebadores para amplificar VIH-1, VIH-2, o la combinación de secuencias VIH-1 y VIH-2 en la región que codifica la integrasa p31 incluye un primer cebador que hibrida los ácidos nucleicos diana que van a ser amplificados (como uno de los cebadores de la Tabla 2) y un segundo cebador que es complementario a la secuencia de un producto de extensión del primer cebador (como una de las secuencias de cebador de la Tabla 1). En una realización altamente preferible, el primer cebador es un promotor-cebador que incluye un secuencia del promotor T7 en su extremo 5'.

Sondas de detección preferibles

Otro aspecto de la invención está relacionado con oligonucleótidos que pueden utilizarse como sondas de hibridación para la detección de VIH-1, VIH-2, o la combinación de ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2. De hecho, los métodos para amplificar una secuencia diana presente en los ácidos

nucleicos de VIH-1 o VIH-2 puede incluir un paso opcional adicional para la detección de amplicones. Este procedimiento para la detección de ácidos nucleicos de VIH-1 y/o VIH-2 incluye un paso para contactar una muestra de pruebas
5 con una sonda de hibridación de pruebas que hibrida con la secuencia diana de ácidos nucleicos, o el complementario de la misma, bajo condiciones hibridación astringentes, formando así un dúplex sonda:diana que es estable para su detección. A continuación hay un paso para determinar si el
10 híbrido está presente en la muestra de ensayo como una indicación de la presencia o ausencia de ácidos nucleicos diana de VIH-1 o VIH-2 en las muestras de prueba. Esto implica la detección del dúplex sonda:diana, y preferiblemente implica los sistemas de ensayo homogéneos.

15 Las sondas de hibridación de prueba útiles para la detección de VIH-1, VIH-2, o la combinación de ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2 incluyen una secuencia de bases sustancialmente complementarias a estas secuencias de ácidos nucleicos diana. Así, las sondas de la invención hibridan
20 una cadena de una secuencia diana de ácidos nucleicos, o el complementario de la misma. Estas sondas opcionalmente pueden tener bases adicionales fuera de la región diana de ácidos nucleicos que puede ser o no complementarias a los ácidos nucleicos diana que deben detectarse.

25 Las sondas preferibles son suficientemente homólogas a los ácidos nucleicos diana para hibridar bajo condiciones de hibridación astringentes correspondientes a alrededor de 60°C cuando la concentración de sal está en el rango de

0,6-0,9 M. Las sales preferibles incluyen cloruro de litio, pero también pueden utilizarse en la solución de hibridación otras sales como el cloruro de sodio y el citrato de sodio. Un ejemplo de las condiciones de hibridación altamente astringentes se proporciona alternativamente mediante tampón fosfato sódico 0,48 M, dodecilsulfato sódico 0,1 %, y 1 mM de EDTA y EGTA, o mediante LiCl 0,6 M, laurilsulfato de litio 1%, succinato de litio 60 mM y 10 mM de EDTA y EGTA.

10 Las sondas de acuerdo con la invención poseen secuencias sustancialmente complementarias a, o sustancialmente correspondientes a porciones de los genomas de VIH-1 y VIH-2. Ciertas sondas que son preferibles para la detección de VIH-1, VIH- 2, o la combinación de secuencias de ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2 poseen una secuencia de sonda que incluye una secuencia de bases complementaria a la diana, y opcionalmente una o más secuencias de bases que no son complementarias a los ácidos nucleicos que deben detectarse. La secuencia de bases complementaria a la diana preferiblemente está en el rango de longitud de 10-100 nucleótidos y es capaz de hibridar con el ácido nucleico amplificado. Ciertas sondas preferibles que son capaces de detectar VIH-1, VIH-2, o la combinación de secuencias de ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2 poseen secuencias complementarias a la diana en el rango de longitud de 10-100, desde 15-60, desde 15-45 o desde 20-30 nucleótidos. Por supuesto, estas secuencias complementarias a la diana pueden ser secuencias lineales, o pueden contener en su estructura una baliza mo-

lecular, una antorcha molecular u otra construcción que posea una o más secuencias de ácidos nucleicos opcionales que no sea complementaria a la secuencia diana que debe detectarse. Tal como se ha indicado anteriormente, las sondas
5 pueden estar constituidas de DNA, RNA, una combinación de DNA y RNA, un análogo de ácidos nucleicos, o contener uno o más nucleósidos modificados (por ejemplo, un ribonucleósido con una substitución 2'-O-metilo en la porción ribofuranosilo).

10 Ciertas sondas de acuerdo con la presente invención incluyen una marca detectable. En una realización esta marca está unida a la sonda mediante un enlace diferente a un nucleótido. Por ejemplo, las sondas de detección pueden marcarse con compuestos de éster de acridinio quimiolumi-
15 niscentes que están unidos mediante un enlazante sustancialmente como se describe en la Patente Estadounidense N° 5.585.481; y en la Patente Estadounidense N° 5.639.604, particularmente como se describe en la columna 10, línea 6 a la columna 11, línea 3, y en el Ejemplo 8.

20 La tabla 3 presenta las secuencias de base de algunas de las sondas de hibridación que se utilizan para la detección de secuencias diana de VIH-1, secuencias diana de VIH-2, o ambas secuencias diana de VIH-1 y VIH-2. Ya que las sondas alternativas para la detección de estos ácidos nucleicos diana pueden hibridar con cadenas de sentido opues-
25 to, la presente descripción también incluye oligonucleótidos que son complementarios a las secuencias presentadas en la tabla.

Tabla 3

<u>Secuencias de polinucleótido de las sondas de detección</u>	
Secuencia	Identificador
CCTGAATTTTAAAAGAAGGGGG	Id. de Sec. N°:23
CCAGAATTTTAAAAGAAGGGGIGG	Id. de Sec. N°:24
CCACAATTTTAAAAGAAGGGGIGG	Id. de Sec. N°:25
CCTGAATTTTAAAAGAAGGGGIGG	Id. de Sec. N°:26
CATGAATTTTAAAAGAAGGGGA	Id. de Sec. N°:27
CCTGAATTTTAAAAGAAIGGGG	Id. de Sec. N°:28
CCIGAATTTTAAAAGAAGGGGG	Id. de Sec. N°:29
CCIIAATTTTAAAAGAAGGGGG	Id. de Sec. N°:30
AAAGAAIGGIGGGGATIGGGIGG	Id. de Sec. N°:31
AAAGAAIGGIGGGGATTGGGIGG	Id. de Sec. N°:32
AATTTTAAAAGAAGAGGIGGGATTGGGGG	Id. de Sec. N°:33
CAATTTTAAAAGAAGGGGIGGG	Id. de Sec. N°:34
GAATTTTAAAAGAAGIGGGGIG	Id. de Sec. N°:35
GAAUUUUAAAAGAAGGGGIGGG	Id. de Sec. N°:36

Tal como se ha indicado anteriormente, cualquier número de diferentes estructuras armazón pueden utilizarse como soporte de las secuencias de las bases de las sondas de hibridación. En ciertas realizaciones altamente preferibles, la sonda incluye un armazón de metoxi, o al menos una unión metoxi en la estructura de soporte de los ácidos nucleicos.

10 Selección y uso de oligonucleótidos de captura

Los oligonucleótidos de captura preferibles incluyen una primera secuencia que es sustancialmente complementaria

a una secuencia diana (es decir, una secuencia "complementaria a la diana") unida de forma covalente a una segunda secuencia (es decir, una secuencia "cola") que sirve como diana para la inmovilización en un soporte sólido. Puede
5 utilizarse cualquier armazón para unir la secuencia de bases de un oligonucleótido de captura. En ciertas realizaciones preferible el oligonucleótido de captura incluye al menos un enlace metoxi en el armazón. La secuencia cola, que está preferiblemente en el extremo 3' de un oligonu-
10 cleótido de captura, se utiliza para hibridar una secuencia de bases complementaria para proporcionar un medio para capturar los ácidos nucleicos diana hibridados en preferencia a otros componentes en la muestra biológica.

Aunque puede utilizarse cualquier secuencia de bases
15 que hibrida a una secuencia de bases complementaria en la secuencia cola, es preferible que la secuencia que hibrida abarque una longitud de alrededor de 5-50 residuos de nucleótidos. Las secuencias cola particularmente preferibles son sustancialmente homopoliméricas, y contienen alrededor
20 de 10 a alrededor de 40 residuos de nucleótidos, o más preferiblemente alrededor de 14 a alrededor de 30 residuos. Un oligonucleótido de captura puede incluir una primera secuencia que hibrida a un polinucleótido diana, y una segunda secuencia que hibrida a un tramo de oligo(dT) inmovili-
25 zado en un soporte sólido.

Utilizando los componentes ilustrados en la Figura 1, un ensayo para la detección de VIH-1, VIH-2, o la combinación de secuencias VIH-1 y VIH-2 en una muestra biológica

incluye los pasos de captura de ácidos nucleicos diana utilizando el oligonucleótido de captura, amplificar la región diana capturada utilizando al menos dos cebadores, y detectar los ácidos nucleicos amplificados mediante la hibridación primero de una sonda marcada con una secuencia que
5 contenida en el ácido nucleico amplificado, y después detectar una señal que resulta de la sonda marcada unida.

El paso de captura preferiblemente utiliza un oligonucleótido de captura que, bajo condiciones de hibridación,
10 una porción del oligonucleótido de captura hibrida de forma específica una secuencia en los ácidos nucleicos diana y una porción de cola sirve como un componente de una pareja de unión, como un ligando (por ejemplo, una pareja de unión biotina-avidina) que permite a la región diana separarse de
15 otros componentes de la muestra. Preferiblemente, la porción cola del oligonucleótido de captura es una secuencia que hibrida con una secuencia complementaria inmovilizada en una partícula de soporte sólido. Preferiblemente, primero, el oligonucleótido de captura y los ácidos nucleicos
20 diana están en una solución para tomar ventaja de la cinética de hibridación de la fase en solución. La hibridación produce un complejo de oligonucleótido de captura:ácidos nucleicos diana que puede unirse a una sonda inmovilizada a través de la hibridación de la porción de cola del oligonucleótido de captura con una secuencia inmovilizada comple-
25 mentaria. Así, se forma un complejo que comprende un ácido nucleico diana, un oligonucleótido de captura y una sonda inmovilizada bajo condiciones de hibridación. Preferible-

mente, la sonda inmovilizada es una secuencia repetitiva, y más preferiblemente una secuencia homopolimérica (por ejemplo, poli-A, poli-T, poli-C o poli-G), que es complementaria a la secuencia de cola y está unida a un soporte sólido. Por ejemplo, si la porción de cola del oligonucleótido de captura contiene una secuencia poli-A, entonces la sonda inmovilizada contendrá una secuencia poli-T, aunque puede utilizarse cualquier combinación de secuencias complementarias. El oligonucleótido de captura puede también contener residuos "espaciadores", que son una o más bases localizadas entre la secuencia de bases que hibrida con la diana y la secuencia de bases de la cola que hibrida con la sonda inmovilizada. Cualquier soporte sólido puede utilizarse para unir el complejo de ácido nucleico diana:oligonucleótido de captura. Los soportes útiles pueden ser matrices o partículas libres en solución (por ejemplo, nitrocelulosa, nilón, vidrio, poliacrilato, polímeros mezclados, poliestireno, polipropileno silano y, preferiblemente, partículas de atracción magnética). Los métodos de unión de una sonda inmovilizada al soporte sólido son bien conocidos. El soporte es preferiblemente una partícula que puede recuperarse de la solución utilizando métodos estándar (por ejemplo, centrifugación, atracción magnética de partículas magnéticas, y similares). Los soportes preferibles son partículas paramagnéticas monodispersables (es decir, uniformes en tamaño 6 alrededor del 5%).

La recuperación del complejo ácido nucleico diana:oligonucleótido de captura:sonda inmovilizada efectiva-

mente concentra los ácidos nucleicos diana (en relación a su concentración en la muestra biológica) y purifica los ácidos nucleicos diana de los inhibidores de amplificación que pueden estar presentes en la muestra biológica. Los

5 ácidos nucleicos diana capturados pueden lavarse una o más veces, además de purificar la diana, por ejemplo, mediante la resuspensión de las partículas con el complejo unido de ácido nucleico diana:oligonucleótido de captura:sonda inmovilizada en una solución de lavado y recuperando después

10 las partículas con el complejo unido de la solución de lavado como se ha descrito anteriormente. En una realización preferible, el paso de captura tiene lugar mediante la hibridación secuencial del oligonucleótido de captura con los ácidos nucleicos diana y después ajustar las condiciones

15 de hibridación para permitir la hibridación de la porción de cola del oligonucleótido de captura con una secuencia complementaria inmovilizada (por ejemplo, como se describe en PCT N° WO 98/50583). Tras completar el paso de captura y cualquier paso opcional de lavado, los ácidos nucleicos diana pueden amplificarse. Para limitar el número

20 de pasos de manipulación, los ácidos nucleicos diana opcionalmente pueden amplificarse sin liberarse de los oligonucleótidos de captura.

Los oligonucleótidos de capturas útiles pueden también

25 contener desemparejamientos en la secuencia de ácidos nucleicos que debe amplificarse. La captura de diana exitosa y la amplificación de ácidos nucleicos puede lograrse siempre y cuando las secuencias desemparejadas hibriden con la

molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia que debe amplificarse. En efecto, los oligonucleótidos para la captura de ácidos nucleicos de VIH-1, como se describe en la solicitud de patente internacional publicada e identificada mediante WO 03/106714, se utilizan para practicar los métodos descritos aquí, lo que incluye métodos para detectar VIH-2.

Métodos preferibles para amplificar y detectar secuencias de polinucleótidos diana

Los métodos preferibles de la presente invención se describen y se ilustran mediante los Ejemplos presentados más abajo. La Figura 1 ilustra de forma esquemática un sistema que puede utilizarse para la detección de una región diana del genoma viral (mostrado por una línea gruesa horizontal). Este sistema básico incluye cuatro oligonucleótidos (mostrados por líneas más cortas): un oligonucleótido de captura que incluye una secuencia que hibrida con una secuencia en la región diana y una cola ("T") que hibrida con una secuencia complementaria inmovilizada en un soporte sólido para capturar la región diana presente en una muestra biológica; un promotor T7-cebador que incluye una secuencia que hibrida específicamente con una secuencia VIH-1 o VIH-2 en la región diana y una secuencia de promotor T7 ("P") que, cuando es de doble cadena, sirve como promotor funcional para la polimerasa de RNA T7; un cebador no T7 que incluye una secuencia que hibrida específicamente con una primera cadena de cDNA constituida por la secuencia de la región diana que utiliza el promotor T7 -cebador; y una

sonda marcada que incluye una secuencia que hibrida específicamente con una porción de la región diana que se amplifica utilizando los dos cebadores.

Tal como se ha indicado anteriormente, amplificar la
5 región diana capturada utilizando los dos cebadores puede lograrse mediante cualquiera de una serie de reacciones de amplificación conocidas de ácidos nucleicos que son familiares a los expertos en la materia. En una realización preferible, se utiliza una reacción de amplificación asociada a la transcripción, como AMT. En dicha realización,
10 se producen muchas cadenas de ácidos nucleicos a partir de una copia única de ácido nucleico diana, permitiendo así la detección de la diana mediante las sondas de detección que están unidas a las secuencias amplificadas. Preferiblemente,
15 te, la amplificación asociada a la transcripción utiliza dos tipos de cebadores (uno se refiere al promotor-cebador debido a que contiene una secuencia promotor, marcada como "P" en la Figura 1, para una polimerasa de RNA) dos enzimas (una transcriptasa inversa y una polimerasa de RNA), y sus-
20 tratos (desoxiribonucleósidos trifosfato, ribonucleósidos trifosfato) con sales y tampones apropiados en solución para producir múltiples transcritos de RNA a partir de moldes de un ácido nucleico.

En referencia a la Figura 1, durante la amplificación
25 mediada por la transcripción, los ácidos nucleicos diana capturados se hibridan a un primer cebador (mostrado como un promotor T7-cebador). Utilizando la transcriptasa inversa, se sintetiza una cadena de DNA complementaria a partir

del promotor T7-cebador utilizando el RNA diana como molde. Un segundo cebador, mostrado como un cebador no T7, hibrida con la cadena de DNA recién sintetizada y se extiende mediante la acción de una transcriptasa inversa para formar un dúplex de DNA, formando así una región promotor T7 de doble cadena. La polimerasa de RNA T7 genera entonces múltiples transcritos de RNA utilizando este promotor T7 funcional. El mecanismo autocatalítico de AMT emplea pasos repetitivos de hibridación y polimerización tras el paso de síntesis de cDNA utilizando los transcritos de RNA como moldes para producir transcritos adicionales, amplificando así las secuencias de ácidos nucleicos específicas de la región diana.

El paso de detección utiliza al menos una sonda de detección que se une específicamente a los transcritos de RNA amplificados o amplicones descritos anteriormente. Preferiblemente, la sonda de detección está marcada con una marca que puede detectarse utilizando un sistema de detección homogéneo. Por ejemplo, la sonda marcada puede marcarse con un compuesto de éster de acridinio del que se puede producir una señal quimioluminiscente y detectarse, como se ha descrito antes. Alternativamente, la sonda marcada puede comprender un fluoróforo o una pareja de fluoróforo y bloqueador. Una baliza molecular es una realización de dicha sonda marcada que puede utilizarse en un sistema de detección homogéneo.

Métodos para la detección de ácidos nucleicos de VIH-1 y/o VIH-2

También se han inventado tres métodos diferentes para detectar ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2 en ensayos multiplex. Cada método se distingue del otro mediante el uso de cebadores con reactividad cruzada o específicos del analito, y también mediante el uso de sondas con reactividad cruzada o específicos del analito.

En el primer método, se utilizan grupos independientes de cebadores específicos del analito, es decir, un primer conjunto de cebadores específicos de ácidos nucleicos de VIH 1 (pero no de ácidos nucleicos de VIH-2) y un segundo grupo de cebadores específicos de VIH-2 (pero no de ácidos nucleicos de VIH-1), para sintetizar amplicones en una única reacción de amplificación. Los amplicones sintetizados se detectaron a continuación utilizando una sonda con reactividad cruzada que es capaz de detectar ambos amplicones de VIH-1 y VIH-2. Los resultados de hibridación positivos obtenidos utilizando este método indican que la muestra de ensayo que proporciona los moldes de ácidos nucleicos para la amplificación contiene VIH-1 o VIH-2, sin distinguir entre los dos analitos.

En el segundo método, se utiliza un conjunto de cebadores con reactividad cruzada para sintetizar los amplicones de VIH-1 y/o de VIH-2 en una única reacción de amplificación. Los amplicones sintetizados se detectaron a continuación utilizando sondas específicas de analito distintas. Una de las sondas es específica para los amplicones de VIH-1 (pero no de los amplicones de VIH-2) mientras que otra de las sondas es específica de los amplicones de VIH-2 (pero

no de los amplicones de VIH-1). El paso para la detección de amplicones sintetizados utilizando los cebadores con reactividad cruzada puede involucrar la combinación de sondas específicas de analito en una única reacción de hibridación, o hibridar de forma separada cada una de las sondas específicas de analito con alícuotas que contienen los productos de la reacción de amplificación. Si las sondas se combinan en una única reacción de hibridación, entonces un resultado positivo indica que una muestra de ensayo contiene VIH-1 o VIH-2, sin distinguir entre los dos analitos. Alternativamente, si las sondas se hibridan de forma separada con alícuotas independientes de la reacción de amplificación, entonces un resultado positivo en una de las reacciones de hibridación indicará que el analito complementario a la sonda contenida en la reacción estaba presente en la muestra de ensayo que proporciona los moldes de ácidos nucleicos para la amplificación.

En el tercer método, se utiliza un conjunto de cebadores con reactividad cruzada para sintetizar los amplicones de VIH-1 y/o amplicones de VIH-2 en una única reacción de amplificación. Los amplicones sintetizados se detectaron a continuación utilizando una sonda con reactividad cruzada que es capaz de detectar ambos amplicones de VIH-1 y amplicones de VIH-2. Los resultados de hibridación positivos obtenidos utilizando este método indica que la muestra de ensayo que proporciona moldes de ácido nucleico para la amplificación contiene VIH-1 o VIH-2, sin distinguir entre los dos analitos.

Los cebadores con reactividad cruzada son particularmente útiles en las reacciones multiplex para amplificar VIH-1 y/o VIH-2. Las reacciones multiplex convencionales normalmente implican el uso de unos cuantos, o incluso varios conjuntos de cebadores independientes, con cada conjunto de cebadores capaces de amplificar un analito de ácido nucleico diferente que puede estar presente en una muestra que se está analizando. Cuando el número de cebadores alcanza un valor umbral, existe la posibilidad que ocurran interacciones indeseables cebador-cebador. Cuando este es el caso, los cebadores pueden consumirse en la producción de productos de extensión indeseables, lo que inhibe la síntesis eficiente de los amplicones específicos de analito. Una solución a este problema es utilizar los cebadores con reactividad cruzada que permiten la amplificación de múltiples analitos, reduciendo así el número de especies de cebadores que deben incluirse en la reacción.

Otro beneficio de los cebadores y sondas con reactividad cruzada también está relacionado con reacciones de amplificación multiplex. Más en particular, el uso preferible de al menos un cebador con reactividad cruzada, y más preferiblemente al menos un conjunto de dos cebadores con reactividad cruzada, en una reacción de amplificación multiplex proporciona redundancia en la detección de al menos uno de los analitos. Esta detección redundante es altamente ventajosa cuando uno de los analitos es propenso a la mutación o existe en formas alternativas que pueden perderse por el uso de un único conjunto de cebadores de amplifica-

ción. Por ejemplo, si una reacción de amplificación multiplex es capaz de detectar VIH-1 y VIH-2, es deseable, de acuerdo con la presente invención, llevar a cabo reacciones de amplificación utilizando al menos un conjunto de cebadores que son capaces de amplificar ambos VIH-1 y VIH- 2. Cuando este es el caso, los cebadores con reactividad cruzada proporcionarán una forma redundante de amplificar el polinucleótido analito de VIH-1. De forma similar, una sonda con reactividad cruzada capaz de hibridar con los amplicones de VIH-1 y con los amplicones de VIH-2 proporciona una forma redundante para la detección de polinucleótido analito de VIH-1 en una reacción de hibridación que contiene una sonda específica para VIH-1 pero no para VIH-2.

Cabe destacar que el nivel deseado de reactividad cruzada entre los cebadores de ensayos multiplex capaces de amplificar porciones de más de dos polinucleótidos de analito está limitada. Por ejemplo, cuando una reacción multiplex es capaz de amplificar porciones de tres diferentes polinucleótidos de analito, un conjunto de cebadores con reactividad cruzada de acuerdo con la invención serán capaces de amplificar porciones de sólo dos de los tres analitos. Cuando una reacción multiplex es capaz de amplificar porciones de cuatro diferentes polinucleótidos de analito, un conjunto de cebadores con reactividad cruzada de acuerdo con la invención será capaz de amplificar porciones de sólo dos de los cuatro analitos o sólo tres de los cuatro analitos. En general, un conjunto de cebadores con reactividad cruzada de acuerdo con la invención será capaz de amplifi-

car porciones de menos del número total de polinucleótidos de analito de lo que puede amplificarse en la reacción multiplex. Esto es claramente distinto de una situación en la que todos los polinucleótidos de analitos de una reacción
5 multiplex se amplifican, pero puede ser el caso cuando uno de los cebadores en una reacción es un cebador oligo-dT.

Equipos para la detección de VIH-1, VIH-2, o la combinación de ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2

La presente descripción también abarca equipos para
10 realizar reacciones de amplificación de polinucleótidos utilizando moldes de ácidos nucleicos virales. Ciertos equipos preferible incluyen una sonda de ensayo de hibridación que posee una secuencia de bases complementaria a la diana, y opcionalmente incluye cebadores u otros oligonu-
15 cleótidos para amplificar la diana que debe detectarse mediante la sonda del ensayo de hibridación. Otros equipos preferibles contienen un par de cebadores de oligonucleótidos que pueden utilizarse para amplificar ácidos nucleicos diana en una reacción de amplificación *in vitro*. Ejemplos
20 de equipos incluye un primer y un segundo oligonucleótido o cebador de amplificación que son complementarios a las cadenas opuestas de la secuencia diana de ácidos nucleicos que deben amplificarse. Los equipos pueden contener además una o más sondas para la detección de los productos de am-
25 plificación sintetizados mediante la acción de los cebadores que están contenidos en el equipo. Aún otros equipos pueden incluir adicionalmente oligonucleótidos de captura para purificar los ácidos nucleicos molde de las otras es-

pecies antes de la amplificación.

Los principios generales de la presente invención pueden apreciarse en su plenitud mediante la referencia a los siguientes Ejemplos no limitantes.

5 El ejemplo 1 describe los procedimientos que identifican alguna de las sondas de hibridación que a continuación se utilizan en los ensayos para la detección de VIH-1, VIH-2, o la combinación de ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2. Más en particular, los siguientes procedimientos emplean
10 oligonucleótidos sintéticos como dianas para las sondas de hibridación. Tal como se indica más adelante, una de las sondas utilizadas en el procedimiento presenta una especificidad sustancialmente equivalente para las dianas VIH-1 y VIH-2.

15 **Ejemplo 1**

Sondas de oligonucleótido para la detección de VIH-1 y/o VIH-2

Los oligonucleótidos diana sintéticos se prepararon de acuerdo con procedimientos estándar de laboratorio utilizando
20 análogos de nucleótido 2'-OMe para imitar las estructuras de RNA. El modelo de diana de VIH-1 posee la secuencia de TCCCCCTTTTCTTTTAAAATTGTGGATGA (Id. de Sec. N°:37), mientras que el modelo de diana de VIH-2 posee la secuencia de TTCCTCCCCTTCTTTTAAAATTCATGCAAT (Id. de Sec. N°:38). Las
25 sondas para hibridar estas dianas sintéticas poseen las secuencias dadas en la Tabla 3, y se prepararon también utilizando análogos de nucleótido 2'-OMe.

Las reacciones de hibridación incluyen alrededor de 2

x 10^6 URL de sonda marcada con AE con una actividad específica de alrededor de $1-7 \times 10^8$ URL/pmol, y alrededor de 0,5 pmol de oligonucleótido diana sintético. Las reacciones de control negativo omiten el oligonucleótido diana. Las sondas numeradas en la Tabla 3 se marcaron con una porción AE unida a la estructura del oligonucleótido mediante un enlazante no nucleótido dispuesto internamente de acuerdo con los procedimientos descritos en la Patente Estadounidense N° 5.585.481 y 5.639.604. Los enlazantes en las sondas de Id. de Sec. N°:23, Id. de Sec. N°:30, Id. de Sec. N°:27, Id. de Sec. N°:28 e Id. de Sec. N°:29 se localizaron entre las posiciones 7 y 8. Los enlazantes en las sondas de Id. de Sec. N°:24 e Id. de Sec. N°:25 se localizaron entre las posiciones 13 y 14. El enlazante en la sonda de Id. de Sec. N°:26 se localizó entre las posiciones 12 y 13. Los enlazantes en las sondas de Id. de Sec. N°:31 e Id. de Sec. N°:32 se localizaron entre las posiciones 17 y 18. El enlazante en la sonda de Id. de Sec. N°:33 se localizó entre las posiciones 26 y 27. El enlazante en la sonda de Id. de Sec. N°: 34 se localizó entre las posiciones 9 y 10. El enlazante en la sonda de Id. de Sec. N°:35 se localizó entre las posiciones 8 y 9. El enlazante en la sonda de Id. de Sec. N°:36 se localizó entre las posiciones 11 y 12. El uso de todas estas posiciones diferentes de enlazante confirman la versatilidad de esta técnica de marcaje. Las hibridaciones de sonda se llevaron a cabo a 60°C durante 15 minutos en volúmenes de 50 ml de una solución tamponada de Tris que incluye los reactivos utilizados en la reacción de amplifi-

cación descrita en el Ejemplo 2. Las reacciones de hibridación fueron seguidas de la adición de una alícuota de tetraborato sódico 0,15 M (pH 8,5), y TRITON X-100 1% (Union Carbide Corporation; Danbury, CT). Estas mezclas se incubaron primero a 60°C durante 10 minutos para inactivar el marcaje quimioluminiscente unido a la sonda no hibridada, y se enfrió brevemente a 4°C antes de la lectura de la señal de hibridación. Se analizó la quimioluminiscencia de la sonda hibridada en cada muestra utilizando un lector de luminescencia en placas LUMISTAR GALAXY (BMG Labtechnologies Inc.; Durham, NC) configurado para la inyección automática de ácido nítrico 1mM y peróxido de hidrógeno 0,1% (v/v), seguido de la inyección de una solución que contiene hidróxido sódico 1 N. Los resultados de las reacciones quimioluminiscentes se midieron en unidades de luz relativas (URL). Los resultados representativos de este procedimiento se resumen en la Tabla 4 para cada una de las tres regiones diana diferentes. En este procedimiento, el valor de la señal/ ruido corresponde con la señal quimioluminiscente (medida en URL) generada por el marcaje asociado con la sonda específicamente hibridada por una señal de fondo medida en ausencia de un ácido nucleico diana. Cada valor representa la media de 5 réplicas.

Tabla 4

Resultados de hibridación de sonda				
Sonda de la región de la Integrasa p31	Diana VIH-1 (Id. de Sec. N°:37)		Diana VIH-2 (Id. de Sec. N°:38)	
	URL restante como % del va- lor T_0	Señal/ Ruido	URL restante como % del va- lor T_0	Señal /Ruido
Id. de Sec. N°:23	2	1	101	58
Id. de Sec. N°:24	7	1	61	8
Id. de Sec. N°:25	110	12	107	11
Id. de Sec. N°:26	6	1	72	13
Id. de Sec. N°:27	7	1	70	11
Id. de Sec. N°:28	1	1	49	35
Id. de Sec. N°:29	3	1	57	18
Id. de Sec. N°:30	4	1	30	10
Id. de Sec. N°:31	80	7	42	4
Id. de Sec. N°:32	60	10	14	2
Id. de Sec. N°:33	50	34	2	1
Id. de Sec. N°:34	21	3	50	8
Id. de Sec. N°:35	2	1	54	31
Id. de Sec. N°:36	13	1	61	5

Los resultados presentados en la Tabla 4 muestran que algunas de las sondas analizadas en el procedimiento proporcionaron una fuerte señal de hibridación tras la interacción con una o ambas secuencias diana. Sólo algunas de las sondas utilizadas en el procedimiento proporcionaron valores de S/R sustancialmente mayores de 10 cuando se

hibridan con al menos una de las dianas sintéticas.

Llama la atención que las secuencias de sonda útiles se distinguen entre ellas por unas diferencias muy sutiles. Por ejemplo, cuando se compara con la sonda que tiene la
5 secuencia de Id. de Sec. N°:24, la sonda de Id. de Sec. N°:26 difiere tan sólo en dos de las veinticuatro posiciones de nucleótido y retiene una fuerte especificidad para la diana de VIH-2. Por otro lado, una sonda con la secuencia de Id. de Sec. N°:25 difiere de la sonda de Id. de Sec.
10 N°:24 en tan sólo una de estas dos posiciones de nucleótido diferentes y no presentan especificidad para la diana de VIH-2. En efecto, la sonda de Id. de Sec. N°:25 no presenta una especificidad sustancial para ninguna de las dos dianas y fue capaz de hibridar con sustancialmente la misma especificidad a las dianas de VIH-1 y VIH-2. En los tres casos,
15 las sondas incluyen una única base análoga de inosina y por lo que no se corresponde con ninguna forma natural de secuencia de ácidos nucleicos de VIH-1 o VIH-2.

Las propiedades inusuales de hibridación de la sonda
20 con la secuencia de Id. de Sec. N°:25 la hace muy útil para la detección de VIH-1 o VIH-2. Un resultado positivo que indica que esta sonda hibrida con los productos de una reacción multiplex que es capaz de amplificar VIH-1 o VIH-2 indica que la muestra de ensayo que proporciona los moldes
25 de ácidos nucleicos para la amplificación contienen al menos uno de los dos analitos. El uso de la sonda con reactividad cruzada de Id. de Sec. N°:25 como componente en un reactivo de sonda de hibridación que contiene una sonda es-

pecífica separada para VIH-1 (pero no para VIH-2) proporciona de forma ventajosa una manera para detectar de forma redundante el analito VIH-1 mientras que proporciona de forma simultánea una manera para la detección de un analito
5 VIH-2. Aunque es menos preferible debido a la recuperación reducida de señal (véase la Tabla 4), puede utilizarse una sonda con la secuencia de Id. de Sec. N°:31 en lugar de la sonda de Id. de Sec. N°:25 en aplicaciones en las que es deseable emplear una sonda que es capaz de hibridar con los
10 ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2.

Las realizaciones altamente preferibles de la descripción, emplean la sonda con reactividad cruzada de Id. de Sec. N°:25 para la detección de los ácidos nucleicos de VIH-1 o VIH-2. Por ejemplo, los equipos pueden incluir una
15 combinación empaquetada de: la sonda de Id. de Sec. N°: 25 y un conjunto de oligonucleótido cebadores que son específicos para VIH-1 (pero no para VIH-2) y un conjunto de oligonucleótido cebadores que son específicos para VIH-2 (pero no para VIH-1). Un equipo alternativo puede incluir una
20 combinación empaquetada de: la sonda de Id. de Sec. N°:25 y un conjunto de oligonucleótido cebadores que tienen reactividad cruzada con VIH-1 y VIH-2, lo que indica que son capaces de amplificar ambos ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2.

25 Las sondas que son útiles para la detección de ácidos nucleicos de VIH-2, pero no de ácidos nucleicos de VIH-1, incluyen: Id. de Sec. N°: 23, Id. de Sec. N°:24, Id. de Sec. N°:26, Id. de Sec. N°:27, Id. de Sec. N°:28, Id. de

Sec. N°:29, Id. de Sec. N°:30, Id. de Sec. N°:35, e Id. de Sec. N°:36.

Las combinaciones de cebador preferibles para amplificar VIH-1, VIH-2, o la combinación de ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2 se identifican en una serie de procedimientos que emplean viriones como fuente de moldes de ácidos nucleicos. Se analizaron cebadores-promotor y cebadores de cadena opuesta en combinación utilizando el método descrito más adelante. Aunque estos procedimientos se llevaron a cabo particularmente utilizando un protocolo de amplificación mediada por transcripción (AMT), los cebadores aquí descritos pueden utilizarse para producir amplicones mediante métodos de amplificación de ácidos nucleicos alternativos *in vitro* que serán familiares a los expertos en la materia.

El ejemplo 2 describe los métodos que identifican cebadores útiles para amplificar la región integrasa p31 de VIH-1 y/o VIH-2.

Ejemplo 2

Identificación de cebadores de amplificación

Un lisado celular de alta titulación que contiene partículas de virus VIH-2 B6 sirvió como fuente de secuencias molde de VIH-2 en las reacciones de amplificación que utilizaron grupos de parejas de cebadores. Se utilizó suero negativo de virus para preparar soluciones de reserva diluidas que contiene 100 copias/ ml de molde de ácidos nucleicos de VIH-1, o 300 copias/ ml de molde de ácidos nucleicos de VIH-2. Por ejemplo, se preparó una solución que contiene 100 copias/ ml de molde de ácidos nucleicos de

VIH-2. Los ácidos nucleicos sufrieron un procesamiento de muestras y captura de diana antes de la amplificación esencialmente de acuerdo con los procedimientos descritos en la Solicitud de patente Internacional publicada N° PCT/US2000/18685, con la excepción que los moldes se capturaron utilizando los oligonucleótidos descritos en la Solicitud de patente Internacional publicada identificada por WO 03/106714 para la captura de ácidos nucleicos de VIH-1. En particular, los oligonucleótidos de captura no participan en los pasos de amplificación o detección del ensayo. Las muestras que contienen virus con volúmenes de 0,5 ml se combinaron con un reactivo de captura de diana para facilitar la liberación de ácidos nucleicos y la hibridación a oligonucleótidos de captura dispuestos en cuentas magnéticas. Las reacciones AMT se llevaron a cabo esencialmente como se describe en Kacian et al., en la patente Estadounidense N° 5.399.491. Los cebadores-promotor incluyen una secuencia promotor T7 AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGA (Id. de Sec. N°:39) río arriba de una secuencia complementaria a la diana. Las reacciones de amplificación se realizaron para varias combinaciones de cebador utilizando 15 pmol de cada cebador en 100 ml de tampón de reacción. Los ácidos nucleicos diana aislados se combinaron con cebadores en un tampón de amplificación estándar de ácidos nucleicos, se calentó a 60°C durante 10 minutos y después se enfrió a 42°C para facilitar la hibridación del cebador. Se añadieron la transcriptasa inversa del virus Moloney de la leucemia murina (MMLV) (5.600 unidades/ reacción) y polimerasa de RNA T7

(3.500 unidades/ reacción) a las mezclas. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en una solución Tris tamponada (pH 8,2 a 8,5) que contiene KCl, desoxiribonucleósido 5'-trifosfato, ribonucleósido 5'-trifosfato, N-acetil-L-cisteína, y glicerol al 5% (p/v), como bien saben los expertos en la materia. Tras una hora de incubación a 42°C, los 100 ml de la reacción de amplificación se sometieron a un ensayo de hibridación esencialmente como se describe en el Ejemplo 1 utilizando una sonda específica de VIH-1 independiente que no tiene hibridación cruzada con el VIH-2, y la sonda específica de VIH-2 de Id. de Sec. N°:23 que no tiene hibridación cruzada con el VIH-1. Las sondas se marcaron con éster de acridinio para las actividades específicas De alrededor de $1-7 \times 10^8$ URL/ pmol y después se utilizó en cantidades equivalentes a alrededor de 2×10^6 URL para cada reacción de hibridación. Las sondas hibridadas específicamente se cuantificaron tras la inactivación química del marcaje quimioluminiscente asociado con la sonda no hibridada en un ensayo homogéneo esencialmente como se describe en el Ejemplo 1. Los ensayos se realizaron utilizando 10 réplicas. A juzgar por el resultado positivo, la señal quimioluminiscente indicó que la hibridación de la sonda había excedido las 50.000 URL en un ensayo.

La tabla 5 presenta los resultados de los procedimientos de amplificación que se realizaron utilizando diferentes combinaciones de cebadores de amplificación. Los valores numéricos que aparecen en la tabla representan el porcentaje de ensayos positivos.

Tabla 5

Amplificación de secuencias de polinucleótido de VIH-1 y VIH-2 utilizando varias combinaciones de cebadores

cebador no T7	Diana (c/ ml)	Secuencia de cebador T7 complementaria a la diana					
		Id. de Sec. N° 11	Id. de Sec. N° 12	Id. de Sec. N° 13	Id. de Sec. N° 14	Id. de Sec. N° 15	Id. de Sec. N° 16
Id. de Sec. N° 1	VIH-1 (100)	0%	0%	100%	ND	ND	100%
	VIH-2 (100)	100%	100%	0%	ND	ND	0%
Id. de Sec. N° 2	VIH-1 (100)	0%	0%	100%	ND	ND	100%
	VIH-2 (100)	100%	100%	0%	ND	ND	ND
	VIH-2 (300)	ND	ND	ND	ND	ND	100%
Id. de Sec. N° 3	VIH-1 (100)	0%	ND	ND	ND	ND	ND
	VIH-2 (100)	100%	100%	100%	ND	ND	ND
Id. de Sec. N° 4	VIH-1 (100)	ND	ND	ND	100%	ND	ND
	VIH-2 (300)	ND	ND	ND	0%	ND	ND
Id. de Sec. N° 5	VIH-1 (100)	ND	ND	ND	100%	ND	ND
	VIH-2 (300)	ND	ND	ND	0%	ND	ND
Id. de Sec. N° 6	VIH-1 (100)	ND	ND	ND	100%	ND	ND
	VIH-2 (300)	ND	ND	ND	0%	ND	ND
Id. de Sec. N° 7	VIH-1 (100)	ND	ND	ND	100%	ND	ND
	VIH-2 (300)	ND	ND	ND	100%	ND	ND
Id. de Sec. N° 8	VIH-1 (100)	ND	ND	ND	100%	ND	ND
	VIH-2 (300)	ND	ND	ND	57%	ND	ND
Id. de Sec. N° 9	VIH-1 (100)	ND	ND	ND	80%	ND	ND
	VIH-2 (300)	ND	ND	ND	50%	ND	ND

"ND" indica no determinado (pareja de cebadores no analizada)

Los resultados presentados en la Tabla 5 muestran que alguna de las combinaciones de cebador proporcionan niveles muy altos de detectabilidad de VIH- 1 y VIH-2, incluso en niveles tan bajos como 50 copias del molde viral por reacción. Más específicamente, se obtuvieron excelentes resultados utilizando un cebador con la secuencia complementaria a la diana de Id. de Sec. N°:2 en combinación con un cebador con la secuencia complementaria a la diana de cualquiera de Id. de Sec. N°:13, Id. de Sec. N°:14, Id. de Sec. N°:15, o Id. de Sec. N°:16. Se lograron también excelentes resultados utilizando un cebador con la secuencia complementaria a la diana de Id. de Sec. N°:14 en combinación con un cebador con la secuencia complementaria a la diana de cualquiera de Id. de Sec. N°:7, Id. de Sec. N°:8, o Id. de Sec. N°:9. Las porciones complementarias a la diana de estos últimos tres cebadores conformaron la secuencia consenso TAGAGACAGNAGTACNAATGGC (Id. de Sec. N°:40), en la que la posición 10 está ocupada por C, T o I, y en la que la posición 16 está ocupada por T o I. Los cebadores que conforman este consenso son preferibles para amplificar los ácidos nucleicos diana VIH-1 o VIH-2. Una combinación de cebadores con las secuencias complementarias a la diana de Id. de Sec. N°:14 e Id. de Sec. N°: 7 ventajosamente son capaces de amplificar el mayor número de variantes genéticas de VIH-1 y VIH-2. En particular, no se observaron reacciones de falsos positivos en estos procedimientos.

Aunque el Ejemplo anterior describe los ensayos realizados utilizando sondas independientes que eran específicas para el VIH-1 (pero no para el VIH-2) y para el VIH-2 (pero no para el VIH-1), la descripción también abarca composi-
5 ciones, equipos y métodos que emplean sondas que presentan reactividad cruzada con VIH-1 y VIH-2. Ejemplos particulares de sondas con reactividad cruzada que pueden utilizarse junto con cualquier combinación de cebadores anteriormente descritos que poseen las secuencias de Id. de Sec. N°:25 e
10 Id. de Sec. N°:31.

La capacidad de un conjunto seleccionado de oligonucleótidos para amplificar y detectar una serie de diferentes aislados de VIH-2 se demuestra a continuación.

El Ejemplo 3 describe procedimientos que demuestran
15 que los cebadores y sondas de la invención son útiles para la detección de un amplio rango de aislados de VIH-2.

Ejemplo 3

Amplio rango de detectabilidad de VIH-2

Los cebadores que tienen las secuencias complementa-
20 rias a la diana de Id. de Sec. N°:7 e Id. de Sec. N°:14 se utilizaron en combinación para amplificar ácidos nucleicos molde de VIH-2 a partir de siete cepas diferentes de VIH-2 que están disponibles como lisados con titulación elevada. Estos especímenes se diluyeron en suero negativo para el
25 virus para producir soluciones con concentraciones del molde viral de 300 copias/ ml. Como en el Ejemplo anterior, las muestras que contienen virus con volúmenes de 0,5 ml se combinaron con un reactivo de captura de dianas para faci-

litar la liberación de ácidos nucleicos y la hibridación a oligonucleótidos de captura que están dispuestos en cuentas magnéticas. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo anterior. Se detectaron los amplicones esencialmente como se describe en el Ejemplo 1, excepto que se utilizó una sonda marcada con AE específica de VIH-2 con la secuencia de Id. de Sec. N°:23, y el paso de detección se llevó a cabo utilizando un luminómetro LEADER HC+ (Gen-Probe Incorporated, CA). Los ensayos que proporcionaron señales de hibridación específicas de al menos 50.000 URL se consideraron como positivas. Todos los ensayos se llevaron a cabo en réplicas de diez. Los resultados de estos procedimientos se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6

<u>Amplificación y detección de diferentes aislados de VIH-2</u>	
Cepa de VIH-2	% Positivo (N=10)
VIH-2 B2	100
VIH-2 B3	100
VIH-2 B4	100
VIH-2 B5	100
VIH-2 B7	100
VIH-2 B8	100
VIH-2 B9	100

Los resultados presentados en la Tabla 6 mostraron que los cebadores con reactividad cruzada con las secuencias complementarias a la diana de Id. de Sec. N°:7 e Id. de Sec. N°:14 fueron capaces de amplificar ácidos nucleicos a partir de una serie de diferentes cepas de VIH-2, y de for-

ma similar que una sonda específica de VIH-2 con la secuencia de Id. de Sec. N°:23 fue capaz de detectar ácidos nucleicos de una serie de diferentes cepas de VIH-2. Estos cebadores y esta sonda representan realizaciones preferibles de la invención.

Aunque el Ejemplo anterior ilustra un ensayo basado en el uso combinado de los cebadores con reactividad cruzada y una sonda específica de analito, la presente invención también abarca las realizaciones en la que los cebadores con reactividad cruzada se utilizan en combinación, o empaquetados en un equipo, con una sonda que también tiene reactividad cruzada, lo que indica que la sonda es capaz de hibridar independientemente con ácidos nucleicos o amplicones de VIH-1 y VIH-2. Los ejemplos particulares de los cebadores con reactividad cruzada y sondas con reactividad cruzada se describen en este documento. Por ejemplo, la sonda específica de VIH-2 ilustrativa utilizada en este Ejemplo puede sustituirse por una sonda con reactividad cruzada identificada por el Id. de Sec. N°:25 o Id. de Sec. N°:31.

El siguiente Ejemplo demuestra que las dos combinaciones diferentes de cebador fueron capaces de amplificar un molde de ácidos nucleicos de VIH-2 en una cantidad igual a 150 copias/ reacción. Significativamente, estos procedimientos de amplificación y detección se realizaron en una mezcla de reacción que fue capaz de la amplificación multiplex de VIH-1, VIH-2, VHB y VHC. Estos resultados mostraron que la presencia de cebadores específicos para dianas ex-

trañas no afectan de forma adversa a la detección del VIH-2.

El Ejemplo 4 describe los procedimientos que demuestran como los cebadores de la invención pueden combinarse en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos multiplex capaz de detectar VIH-1, VIH-2, VHB y VHC.

Ejemplo 4

Amplificación de los ácidos nucleicos del VIH-2 en un ensayo multiplex

Los cebadores con las secuencias de Id. de Sec. N°:20 (Secuencia complementaria a la diana de (Id. de Sec. N°:14) e Id. de Sec. N°:2 o Id. de Sec. N°:7 se añadieron a una formulación de reacción que incluye cebadores capaces de amplificar analitos que incluye VIH-1, VHB y VHC. Las formulaciones de ensayo multiplex para realizar la captura de diana, amplificación y detección basada en la sonda de estas dianas se describe en la solicitud de patente internacional publicada e identificada por WO 03/106714. Como en el Ejemplo 2, se prepararon las muestras que contienen viriones de VIH-1 o VIH-2 diluyendo soluciones de titulación elevada con suero libre de virus. Las reacciones de captura de diana y de amplificación de ácidos nucleicos se realizaron utilizando 0,5 ml de muestra de virus diluida, tal como se describe en este documento. La detección de amplicones de VIH-2 mediante los procedimientos descritos anteriormente se llevaron a cabo utilizando la sonda específica de VIH-2 de Id. de Sec. N°:23, junto con las sondas específicas para la detección de amplicones de VIH-1, VHB y VHC.

Los ensayos que proporcionan señales de hibridación específicas de al menos 50.000 URL se consideraron como positivas. Los resultados de estos procedimientos aparecen en la Tabla 7.

5 **Tabla 7**

<u>Detección de VIH-2 en un ensayo multiplex</u>		
Secuencias de cebador complementarias a la diana	Diana	% Positivo
Id. de Sec. N°:2	VIH-1 Tipo B (100 c/ ml)	100% (N=10)
Id. de Sec. N°:14	VIH-2 B8 (300 c/ ml)	100% (N=10)
Id. de Sec. N°:7	VIH-1 Tipo B (100 c/ ml)	100% (N=40)
Id. de Sec. N°:14	VIH-2 B7 (300 c/ ml)	100% (N=40)

Los resultados presentados en la Tabla 7 confirmó que las diferentes combinaciones de los cebadores de la invención fueron capaces de detectar eficientemente ácidos nucleicos diana de VIH-2 en reacciones multiplex que fueron
10 también capaces de amplificar y detectar VIH-1, VHB y VHC.

Además de los ensayos descritos anteriormente que detectan secuencias de VIH-1 y VIH-2 en las regiones que codifica la integrasa p31, una segunda región diana, localizada en el gen que codifica la transcriptasa inversa p51
15 (TI), se encontró también que era útil para la detección de ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2. Los métodos utilizados para hacer esta segunda demostración fueron esencialmente como se ha descrito antes. Las sondas de oligonucleótido utilizadas en los procedimientos para identificar con son-

das de reactividad cruzada en la región diana RT de p51 poseen las secuencias presentadas en la Tabla 8.

Tabla 8

<u>Secuencias de sondas de detección</u>	
Secuencia	Identificador
AGGCAGUAUACUGCAUUUACCIUACC	Id. de Sec. N°:41
GTATACTGCATTTACCCTACC	Id. de Sec. N°:42
AGGAAGUAUACUGCAUUUACCIUACC	Id. de Sec. N°:43
AGGAAGUAUACUGCAUUUACCAUACC	Id. de Sec. N°:44

El Ejemplo 5 describe los procedimientos utilizados para identificar sondas candidatas con reactividad cruzada que hibridan con las regiones RT de p51 de los ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2.

Ejemplo 5

Sondas de oligonucleótido para la detección de VIH-1 y/o VIH-2

Los oligonucleótidos diana sintéticos se prepararon de acuerdo con procedimientos estándar de laboratorio. La diana VIH-1 modelo posee la secuencia CUAGGUAUGGUAUACUAGUAUACUUC (Id. de Sec. N°:45), mientras que la diana VIH-2 modelo posee la secuencia de GAUGGUAGGGUAAAUGCAGUAUACU (Id. de Sec. N°:46). Las dianas de VIH-1 y VIH-2 se sintetizaron utilizando precursores de RNA. Las sondas para hibridar estas dianas sintéticas poseen las secuencias dadas en la Tabla 8, y se prepararon utilizando análogos de nucleótido 2'-OMe.

Las reacciones de hibridación incluyen alrededor de 2×10^6 URL de sonda marcada con AE con una actividad especí-

fica de alrededor de $1-7 \times 10^8$ URL/ pmol, y alrededor de 0,5 pmol de oligonucleótido diana sintético. Las reacciones de control negativo omitieron el oligonucleótido diana. Las sondas de la Tabla 8 se marcaron con una porción AE junto
5 con la estructura de oligonucleótido mediante un enlazante no nucleótido dispuesto internamente de acuerdo con los procedimientos descritos en las Patentes Estadounidenses N° 5.585.481 y 5.639.604. El enlazante en la sonda de Id. de Sec. N°:42, alternativamente se localizó entre los nucleó-
10 tidos 7 y 8, entre los nucleótidos 11 y 12, o entre los nucleótidos 12 y 13. Los enlazantes en las sondas de Id. de Sec. N°:41, Id. de Sec. N°:43, e Id. de Sec. N°:44 se localizaron todos entre los nucleótidos 12 y 13. El uso de estas posiciones de enlazante confirmó la versati-
15 lidad de esta técnica de marcaje. Las hibridaciones de la sonda se llevaron a cabo a 60°C durante 15 minutos en volúmenes de 50 ml de un solución tamponada de Tris que incluye los reactivos utilizados en la reacción de amplificación descrita en el Ejemplo 2. Las reacciones de hibridación
20 fueron seguidas de la adición de una alícuota de tetraborato sódico 0,15 M (pH 8,5), y TRITON X-100 1% (Union Carbide Corporation; Danbury, CT). Estas mezclas se incubaron primero a 60°C durante 10 minutos para inactivar el marcaje quimioluminiscente unido a la sonda no hibridada, y enfria-
25 do brevemente a 4°C antes de leer la señal de hibridación. La quimioluminiscencia debido a la sonda hibridada en cada muestra se analizó utilizando un lector de luminiscencia en placas LUMISTAR GALAXY (BMG Labtechnologies Inc.; Durham,

NC) configurado para la inyección automática de ácido nítrico 1 mM y peróxido de hidrógeno al 0,1% (v/v), seguido de la inyección de una solución que contiene hidróxido sódico 1 N. Los resultados para las reacciones quimioluminiscentes se midieron en unidades relativas de luz (URL). Los resultados representativos de este procedimiento se resume en la Tabla 9 para cada una de las tres diferentes secuencias de sonda. En este procedimiento, el valor de señal/ruido corresponde con la señal quimioluminiscente (medida en URL) generada por el marcaje asociado con la sonda específicamente hibridada dividida entre la señal de fondo medida en ausencia de un ácido nucleico diana. Cada valor representa la media de 5 réplicas.

Tabla 9

Resultados de la hibridación de sondas				
Región de sonda RT de p51	Diana VIH-1 (Id. de Sec. N°:45)		Diana VIH-2 (Id. de Sec. N°:46)	
	URL restante como % del valor T_0	Señal/ Ruido	URL restante como % del valor T_0	Señal/ Ruido
Id. de Sec. N°:41	66,7	5,1	66,1	5,0
Id. de Sec. N°:42	111,4	296,2	101,5	269,8
Id. de Sec. N°:43	103,7	159,9	97,7	150,7
Id. de Sec. N°:44	112,8	162,8	114,1	164,6

Los resultados presentados en la Tabla 9 muestran que la mayoría de las sondas analizadas en el procedimiento proporcionaron fuertes señales de hibridación y relaciones señal /ruido tras la interacción con cada una de las dife-

rentes secuencias diana. En particular, el resultado presentado para la sonda de Id. de Sec. N°:42 se obtuvo utilizando la sonda con su marcaje posicionado entre los nucleótidos 12 y 13. No obstante, también se lograron excelentes resultados utilizando la misma secuencia de sonda con los 5 marcajes posicionados de forma alternativa. Más específicamente, los valores de señal /ruido para la colección de tres sondas de Id. de Sec. N°:42 estuvieron en el rango desde alrededor de 218 hasta alrededor de 296 para la diana 10 VIH-1, y desde alrededor de 220 a alrededor de 282 para la diana VIH-2. Además de las sondas con la secuencia de Id. de Sec. N°:42, las sondas de Id. de Sec. N°:43 e Id. de Sec. N°:44 son también altamente preferibles para la detección de uno o ambos ácidos nucleicos diana de VIH-1 y VIH- 15 2. Por descontado, los complementarios de estas secuencias también son alternativas preferibles.

Llama la atención, que las sondas con alto rendimiento en el ensayo descrito anterior, incluían todas las secuencias complementarias a la diana de las bases 21-26 contiguas, contenidas en la secuencia consenso proporcionada por 20 AGGAAGTATACTGCATTTACCNACC (Id. de Sec. N°:62), permitiendo las bases equivalentes de RNA y DNA, en la que "N" es cualquiera de A, C o 1. La sonda 26-mera de Id. de Sec. N°:41 no tuvo un buen rendimiento en el ensayo de hibridación 25 (véase Tabla 9), y no se ajusta a la secuencia consenso. En particular, esta sonda de bajo rendimiento difiere de la sonda con reactividad cruzada de Id. de Sec. N°:43, que tuvo un buen rendimiento en el ensayo, con tan sólo un cambio

de base único. Esto ilustra la naturaleza inusual e inesperada de las ventajas de la sonda con reactividad cruzada como se ha descrito antes.

Las realizaciones altamente preferibles de la invención emplean una o más sondas con reactividad cruzada de Id. de Sec. N°:42, Id. de Sec. N°:43 o Id. de Sec. N°:44 para la detección de cualquiera de los ácidos nucleicos de VIH-1 o VIH-2. No obstante, los equipos pueden incluir en combinaciones envasadas: cualquier sonda con la secuencia de Id. de Sec. N°:42, Id. de Sec. N°:43 o Id. de Sec. N°:44 y un conjunto de oligonucleótido cebadores que son específicos para VIH-1 (pero no para VIH-2) y/o un conjunto de oligonucleótido cebadores que son específicos para VIH-2 (pero no para VIH-1). Un equipo alternativo puede incluir en combinaciones envasadas: cualquier sonda con la secuencia de Id. de Sec. N°:42, Id. de Sec. N°:43 o Id. de Sec. N°:44 y un conjunto de oligonucleótido cebadores que tienen reactividad cruzada con VIH-1 y VIH-2, lo que indica que son cebadores capaces de amplificar ambos ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2. Las sondas con reactividad cruzada son particularmente preferibles para utilizar en los métodos en los que los amplicones de VIH-1 o VIH-2 sintetizados se detectan utilizando los cebadores de amplificación con reactividad cruzada descritos en el siguiente Ejemplo.

En particular, en ciertas realizaciones será deseable utilizar sondas con las secuencias unidas al extremo 5' o 3' de las secuencias de la sonda complementaria a la diana, cuyas secuencias no son complementarias, lo que quiere de-

cir que no hibridan con los amplicones de VIH-1 o VIH-2. En estos casos es preferible que la longitud total de la molécula de la sonda sea de hasta 60 bases, más preferiblemente de hasta 26 bases de longitud. Ejemplos de las secuencias
5 unidades que no son complementarias a los amplicones de VIH-1 o de VIH-2 incluyen las secuencias del "brazo" que comprenden las porciones "principales" de las balizas moleculares.

Las combinaciones de cebador preferibles para amplificar VIH-1 o VIH-2, o la combinación de ácidos nucleicos de
10 VIH-1 y VIH-2 se identificaron en una serie de procedimientos que emplearon viriones como la fuente del molde de los ácidos nucleicos. Los cebadores promotor y los cebadores de la cadena opuesta se analizaron en combinación utilizando el método descrito anteriormente. Aunque estos procedimientos
15 se llevaron a cabo particularmente utilizando un protocolo de amplificación mediada por transcripción (AMT), los cebadores aquí descritos pueden utilizarse para producir amplicones mediante métodos de amplificación de ácidos nucleicos alternativos *in vitro* que serán familiares a los
20 expertos en la materia. Las Tablas 10 y 11 presentan las secuencias de cebadores de amplificación que se utilizaron en los procedimientos descritos bajo el Ejemplo 6. En particular, los cebadores de Id. de Sec. N°: 51-54 corresponden a los cebadores de Id. de Sec. N° :55 - 58, respectivamente,
25 pero además incluyen secuencias de promotor río arriba que no son complementarias a las dianas de VIH-1 y VIH-2.

Tabla 10

<u>Secuencias de cebadores de amplificación</u>	
Secuencia	Identificador
CTTAGATAAAGAITTCAGGAAGTATA	Id. de Sec. N°:47
CTTAGATAAAGATTTTAGGAAGTATA	Id. de Sec. N°:48
CTTAGATAAAGATTTTAGGCAGTATA	Id. de Sec. N°:49
CTTAGATAAAGATTTTAGGIAGTATA	Id. de Sec. N°:50

Tabla 11

<u>Secuencias de cebadores de amplificación</u>		
Característica	Secuencia	Identificador
Complementario a la diana	TTGCTGGTGATCCCTTCCATCCTTGTGG	Id. de Sec. N°:51
Complementario a la diana	TTGCTGGTGATCCCTTCCATCCCTGTGG	Id. de Sec. N°:52
Complementario a la diana	TTGCTGGTGATCCTTTCCATCC	Id. de Sec. N°:53
Complementario a la diana	TTGCTGGTGATCCCTTCCATCC	Id. de Sec. N°:54
Cebador del Promotor T7	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGA TTGCTGGTGATCCCTTCCATCCTTGTGG	Id. de Sec. N°:55
Cebador del Promotor T7	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGA TTGCTGGTGATCCCTTCCATCCCTGTGG	Id. de Sec. N°:56
Cebador del Promotor T7	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGA TTGCTGGTGATCCTTTCCATCC	Id. de Sec. N°:57
Cebador del Promotor T7	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGA TTGCTGGTGATCCCTTCCATCC	Id. de Sec. N°:58

El Ejemplo 6 describe los métodos que identifican los

cebadores útiles para amplificar la región RT de p51 de VIH-1 y/o VIH-2.

Ejemplo 6

Identificación de cebadores de amplificación

5 Las partículas del virus VIH-2 B6 derivadas de cultivo de tejidos sirvió como fuente de secuencias molde de VIH-2 en reacciones de amplificación que emplearon grupos de parejas de cebadores. El suero sin virus se utilizó para preparar soluciones de reserva diluidas que contienen 100 copias/ ml del molde de ácidos nucleicos de VIH-1, o 300 copias/ ml el molde de ácidos nucleicos de VIH-2. Los ácidos nucleicos sufrieron un procesamiento de especímenes y captura de diana antes de la amplificación esencialmente de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente internacional publicada N° PCT/ US2000/18685, excepto que los moldes se capturaron utilizando los oligonucleótidos descritos en la solicitud de patente internacional publicada e identificada mediante WO 03/106.714 para la captura de ácidos nucleicos de VIH-1. En particular, los oligonucleótidos de captura no participan en los pasos de amplificación o detección del ensayo. Las muestras que contienen virus que poseen volúmenes de 0,5 ml se combinaron con un reactivo de captura de dianas para facilitar la liberación de los ácidos nucleicos y la hibridación a los oligonucleótidos de captura dispuestos en las cuentas magnéticas. Las reacciones AMT se llevaron a cabo esencialmente como se describe en Kacian et al., en la Patente Estadounidense N° 5.399.491. Los cebadores-promotor incluyen

10

15

20

25

una secuencia promotor T7 proporcionada por el Id. de Sec. N°:39 río arriba de una secuencia complementaria a la diana. Las reacciones de amplificación se realizaron para varias combinaciones de cebador utilizando 15 pmol de cada
5 cebador en 100 µl de tampón de reacción. Los ácidos nucleicos diana aislados se combinaron con cebadores en un tampón estándar de amplificación de ácidos nucleicos, se calentó a 60°C durante 10 minutos y después se enfrió a 42°C para facilitar la hibridación del cebador. Se añadió a las mezclas
10 virus Moloney de leucemia murina (MMLV), transcriptasa inversa (5.600 unidades/ reacción) y polimerasa de RNA T7 (3.500 unidades/ reacción). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en una solución Tris tamponada (pH 8,2 a 8,5) que contiene KCl, desoxiribonucleósido 5'-trifosfato,
15 ribonucleósido 5'-trifosfato, N-acetil-L-cisteína, y glicerol al 5% (p/v), como es familiar a los expertos en la materia. Tras una hora de incubación a 42°C, los 100 µl de la reacción de amplificación se sometieron a un ensayo de hibridación esencialmente como se describe en el Ejemplo 1
20 utilizando una mezcla de la sonda descrita anteriormente con la secuencia de Id. de Sec. N°:42. Para el propósito de esta demostración, una mezcla de sondas con la secuencia de Id. de Sec. N°:42 con los marcajes posicionados entre los nucleótidos 7 y 8, 11 y 12, y 12 y 13 se utilizaron en una
25 proporción de 2:1:1, respectivamente. Las sondas se marcaron con éster de acridinio para las actividades específicas de alrededor de $1-7 \times 10^8$ URL/ pmol y después se utilizaron en cantidades equivalentes a alrededor de 2×10^6 URL para

cada reacción de hibridación. La sonda específicamente hibridada se cuantificó tras la inactivación química del marcaje quimioluminiscente asociado a la sonda no hibridada en un ensayo homogéneo esencialmente como se describe en el

5 Ejemplo 1. Los ensayos se realizaron utilizando 10 réplicas. A juzgar por el resultado positivo, la señal quimioluminiscente que indica la hibridación de la sonda debe exceder 50.000 URL en un ensayo.

La Tabla 12 presenta los resultados de los procedimientos de amplificación que se realizaron utilizando diferentes combinaciones de cebadores de amplificación. Los valores numéricos que aparecen en la Tabla representan el porcentaje de ensayos positivos.

Tabla 12

15 Amplificación de secuencias de polinucleótido de VIH-1 y VIH-2 utilizando varias combinaciones de cebadores

cebador no T7	Diana (c/ml)	Secuencia de cebador T7 complementaria a la diana			
		Id. de Sec. N° 51	Id. de Sec. N° 52	Id. de Sec. N° 53	Id. de Sec. N° 54
Id. de Sec. N° 47	VIH-1 (100)	100%	ND	100%	ND
	VIH-2 (300)	100%	ND	100%	ND
Id. de Sec. N° 48	VIH-1 (100)	ND	100%	ND	100%
	VIH-2 (300)	ND	100%	ND	100%
Id. de Sec. N° 49	VIH-1 (100)	100%	ND	100%	ND
	VIH-2 (300)	100%	ND	100%	ND
Id. de Sec. N° 50	VIH-1 (100)	100%	ND	100%	ND
	VIH-2 (300)	100%	ND	100%	ND

Los resultados presentados en la Tabla 12 muestran que todas las combinaciones seleccionadas de cebador fueron útiles para la detección de VIH-1 y VIH-2. Las porciones complementarias a la diana de los cebadores útiles complementarios a una cadena de la diana a amplificar, incluye una secuencia constituida por el consenso TTGCTGGTGATCCYT-TCCATCC (Id. de Sec. N°:59), en la que la posición 14 está ocupada por C o T, y posee una longitud de hasta 28 bases. En una realización preferible, el cebador constituida por la secuencia consenso TTGCTGGTGATCCYTTCCATCCYTGTGG (S Id. de Sec. N°:60), en la que las posiciones 14 y 23 están independientemente ocupadas por C o T. Los cebadores preferibles pueden además incluir secuencias 5' opcionales que no son complementarias a la diana de VIH-1 o VIH-2 a amplificar. Las porciones complementarias a la diana de los cebadores útiles de una cadena opuesta a la secuencia consenso CTTAGATAAAGANTTYAGGNAGTATA (Id. de Sec. N°:61), en la que la posición 13 está ocupada por T o I, en la que la posición 16 está ocupada por C o T, y en la que la posición 20 está ocupada por A, C o I. Los cebadores que conforman este consenso también son preferibles para amplificar ácidos nucleicos diana de VIH-1 o VIH-2, y pueden además incluir secuencias 5' opcionales que no son complementarias a la de diana VIH-1 o VIH-2 a amplificar. En particular, no se observaron reacciones falso positivas en los procedimientos descritos anteriormente.

Aunque el Ejemplo anterior ilustra un ensayo basado en el uso combinado de los cebadores con reactividad cruzada y

con sondas con reactividad cruzada, la presente descripción también abarca realizaciones en las que los cebadores con reactividad cruzada se utilizan en combinación, o envasados en un equipo, con sondas independientes, específicas de
5 analito de VIH-1 y VIH-2.

El siguiente Ejemplo demuestra que los cebadores de la región RT de p51 con reactividad cruzada aquí descritos fueron capaces de amplificar moldes de VIH-1 y VIH-2 aún cuando los procedimientos se realizaron en una mezcla de
10 reacción que fue capaz de la amplificación multiplex de HTV-1, VIH-2, VHB y VHC. Estos resultados muestran que la presencia de cebadores específicos para dianas extrañas no impactan de forma adversa la detección de VIH-2.

El Ejemplo 7 describe los procedimientos que demuestran como los cebadores pueden combinarse en una reacción
15 multiplex de amplificación de ácidos nucleicos capaz de detectar VIH-1, VIH-2, VHB y VHC.

Ejemplo 7

Amplificación de ácidos nucleicos de VIH-2 en un ensa-
20 yo multiplex

Los cebadores con las secuencias de Id. de Sec. N°:57 (Secuencia complementaria a la diana de Id. de Sec. N°:53) e Id. de Sec. N°:49 se añadieron a la formulación de reacción que incluye cebadores capaces de amplificar los anali-
25 tos que incluyen cualquier combinación de HBV y VHC, o la combinación de VIH-1, VHB y VHC. Las formulaciones de ensayo multiplex para realizar capturas de dianas, la amplificación y la detección basada en sondas de estas dianas se

describen en la solicitud de patente internacional publicada e identificada por WO 03/106714. Como en el Ejemplo 2, las muestras que contienen los viriones de VIH-1 o de VIH-2 se prepararon mediante la dilución de soluciones de reserva de titulación elevada con suero sin virus. Las reacciones de captura de diana y las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos se realizaron utilizando 0,5 ml de muestras de virus diluido, como se ha descrito aquí. La detección de amplicones de VIH-2 se llevó a cabo utilizando el reactivo de sonda descrito en el Ejemplo anterior. La detección de amplicones de VHB y VHC se llevó a cabo utilizando las sondas de hibridación marcadas específicas para estas dianas. Los ensayos que proporcionan señales de hibridación específicas de al menos 50.000 URL se consideraron como positivas. Los resultados de estos procedimientos aparecen en la Tabla 13.

Tabla 13

Detección de VIH-2 en un ensayo multiplex		
Secuencia de cebador complementario a la diana	Diana	% Positivo
Id. de Sec. N°:53	VIH-1 tipo B (100 c/ ml)	100%
	VIH-2 tipo A (300 c/ ml)	100%
Id. de Sec. N°:49	VHC (60 c/ ml)	100%
	VHB (15 IU/ ml)	100%

Los resultados presentados en la Tabla 13 confirman que los cebadores fueron capaces de amplificar eficientemente los ácidos nucleicos de la diana VIH-1 y VIH-2 en re-

acciones multiplex que fueron también capaces de amplificar y detectar otras dianas virales. También como se muestra en la tabla, los niveles bajos de dianas de VHB (15 IU/ ml) y VHC subtipo 2b (60 copias/ ml) se detectaron eficientemente

5 en las reacciones multiplex capaces de amplificar VIH-1 y VIH-2. Significativamente, se obtuvieron los mismos resultados utilizando las condiciones de reacción incluidas u omitidas con los cebadores específicos de amplificación de VIH-1. Así, los cebadores descritos de VIH-1/-2 con reactividad cruzada detectaron eficientemente ambos VIH-1 y VIH-

10 2, y no interfieren con la amplificación y detección de las restantes dianas virales en la reacción multiplex.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Gen-Probe Incorporated Linnen, Jeffrey M. Wu,
Wen

<120> Composiciones, Métodos y Equipos para la detec-
5 ción de ácidos nucleicos del VIH-1 y VIH-2

<130> GP149

<150> US 60/531,183

<151> 2003-12-19

<150> US 60/584,706

10 <151> 2004-06-30

<160> 62

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 19

15 <212> DNA

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 1

acagcagtag aaatggcag 19

<210> 2

20 <211> 20

<212> DNA

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 2

acaacagtag aaatggcagt 20

25 <210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 3
acaatagtagtac taatggcagt 20
<210> 4
<211> 22
5 <212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 4
ttaagacagc agtacaaatg gc 22
<210> 5
10 <211> 22
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 5
tagagacagc agtacaaatg gc 22
15 <210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>
20 <221> característica miscelánea
<222> (16)..(16)
<223> inosina
<400> 6
tagagacagc agtacnaatg gc 22
25 <210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (16)..(16)
<223> inosina
5 <400> 7
tagagacagt agtacnaatg gc 22
<210> 8
<211> 22
<212> DNA
10 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 8
tagagacagc agtactaatg gc 22
<210> 9
<211> 22
15 <212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (10)..(10)
20 <223> inosina
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (16)..(16)
<223> inosina
25 <400> 9
tagagacagn agtacnaatg gc 22
<210> 10
<211> 17

<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>
<221> característica miscelánea
5 <222> (11)..(11)
<223> posición 11 ocupada por A o T/U
<400> 10 a
caryagtac waatggc 17
<210> 11
10 <211> 27
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 11
atttcttggt ctgtggtaat catgttg 27
15 <210> 12
<211> 32
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 12
20 ttgtttttgt aatagttgta tttcttggtc tg 32
<210> 13
<211> 44
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
25 <400> 13
gtttgtatgt ctgttgctat tatgtctatt agtctttctg ctgg 44
<210> 14
<211> 38

<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 14
gtttgtatgt ctgttgctat catgttgatt attctttc 38
5 <210> 15
<211> 35
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 15
10 atttggtttt gtaattcttg tatttctatg tctgt 35
<210> 16
<211> 28
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
15 <400> 16
gtttgtatgt ctgttgctat tatgtcta 28
<210> 17
<211> 54
<212> DNA
20 <213> Artificial
<220>
<223> T7 promotor-cebador
<400> 17
aatttaatac gactcactat agggagaatt tcttgttctg tggtaatcat
25 gttg 54
<210> 18
<211> 59
<212> DNA

```

<213> Artificial
<220>
<223> T7 promotor-cebador
<400> 18
5      aatttaatac gactcactat agggagattg tttttgtaat agttgtattt
      cttgttctg 59
      <210> 19
      <211> 71
      <212> DNA
10     <213> Artificial
      <220>
      <223> T7 promotor-cebador
      <400> 19
      aatttaatac gactcactat agggagagtt tgtatgtctg ttgctattat gtctattagt      60
15     cttttctgctg g      71
      <210> 20
      <211> 65
      <212> DNA
      <213> Artificial
20     <220>
      <223> T7 promotor-cebador
      <400> 20
      aatttaatac gactcactat agggagagtt tgtatgtctg ttgctatcat gttgattatt      60
25     ctttc      65
      <210> 21
      <211> 62
      <212> DNA
      <213> Artificial

```

<220>
<223> T7 promotor-cebador
<400> 21
aatttaatac gactcactat agggagaatt tgtttttgta attcttgtat ttctatgtct 60
gt 62
5
<210> 22
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial
10
<220>
<223> T7 promotor-cebador
<400> 22
aatttaatac gactcactat agggagagtt tgtatgtctg ttgctattat gtcta 55
<210> 23
15
<211> 22
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 23
cctgaattttt aaaagaaggg gg 22
20
<210> 24
<211> 24
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>
25
<221> característica miscelánea
<222> (22)..(22)
<223> inosina
<400> 24

ccagaattttt aaaagaaggg gngg 24
<210> 25
<211> 24
<212> DNA
5 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (22)..(22)
<223> inosina
10 <400> 25
ccacaattttt aaaagaaggg gngg 24
<210> 26
<211> 24
<212> DNA
15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (22)..(22)
<223> inosina
20 <400> 26
cctgaattttt aaaagaaggg gngg 24
<210> 27
<211> 22
<212> DNA
25 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 27
catgaattttt aaaagaaggg ga 22
<210> 28

<211> 22
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>
5 <221> característica miscelánea
<222> (18)..(18)
<223> inosina
<400> 28
cctgaattttt aaaagaangg gg 22
10 <210> 29
<211> 22
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>
15 <221> característica miscelánea
<222> (3)..(3)
<223> inosina
<400> 29
ccngaattttt aaaagaaggg gg 22
20 <210> 30
<211> 22
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>
25 <221> característica miscelánea
<222> (3)..(3)
<223> inosina
<220>

<221> característica miscelánea
<222> (4)..(4)
<223> inosina
<400> 30

5 ccnaattttt aaaagaaggg gg 22
<210> 31
<211> 23
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

10 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (7)..(7)
<223> inosina
<220>

15 <221> característica miscelánea
<222> (10)..(10)
<223> inosina
<220>
<221> característica miscelánea

20 <222> (17)..(17)
<223> inosina
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (21)..(21)

25 <223> inosina
<400> 31
23 aaagaanggn ggggatnggg ngg 23
<210> 32

<211> 23
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>
5 <221> característica miscelánea
<222> (7)..(7)
<223> inosina
<220>
<221> característica miscelánea
10 <222> (10)..(10)
<223> inosina
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (21)..(21)
15 <223> inosina
<400> 32
23 aaagaanggn ggggattggg ngg 23
<210> 33
<211> 29
20 <212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (18)..(18)
25 <223> inosina
<400> 33
aatttttaaaa gaagaggngg gattggggg 29
<210> 34

<211> 22
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>
5 <221> característica miscelánea
<222> (19)..(19)
<223> inosina
<400> 34
caatttttaa agaaggggng gg 22
10 <210> 35
<211> 22
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>
15 <221> característica miscelánea
<222> (16)..(16)
<223> inosina
<220>
<221> característica miscelánea
20 <222> (21)..(21)
<223> inosina
<400> 35
gaatttttaa agaagngggg ng 22
<210> 36
25 <211> 22
<212> RNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>

<221> característica miscelánea
<222> (19)..(19)
<223> inosina
<400> 36
5 gaauuuuuaaa agaaggggng gg 22
<210> 37
<211> 30
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
10 <400> 37
tcccccccttt tctttttaaaa ttgtggatga 30
<210> 38
<211> 30
<212> DNA
15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 38
ttcctcccct tctttttaaaa ttcattgcaat 30
<210> 39
<211> 27
20 <212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> secuencia promotor del fago T7
<400> 39
25 aatttaatac gactcactat agggaga 27
<210> 40
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial
<220>
<223> secuencia consenso artificial del VIH
<220>
5 <221> característica miscelánea
<222> (10)..(10)
<223> posición ocupada por C, T o I (inosina)
<220>
<221> característica miscelánea
10 <222> (16)..(16)
<223> posición ocupada por T o I (inosina)
<400> 40
tagagacagn agtacnaatg gc 22
<210> 41
15 <211> 26
<212> RNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>
<221> característica miscelánea
20 <222> (22)..(22)
<223> inosina
<400> 41
aggcaguaua cugcauuuac cnuacc 26
<210> 42
25 <211> 21
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 42

gtataactgca tttaccctac c 21
<210> 43
<211> 26
<212> RNA
5 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (22)..(22)
<223> inosina
10 <400> 43
aggaaguaua cugcauuuac cnuacc 26
<210> 44
<211> 26
<212> RNA
15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 44
aggaaguaua cugcauuuac cauacc 26
<210> 45
<211> 27
20 <212> RNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 45
cuagguauagg uaaaugcagu auacuuc 27
<210> 46
25 <211> 25
<212> RNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 46

gaugguaggg uaaaugcagu auacu 25
<210> 47
<211> 26
<212> DNA
5 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (13)..(13)
<223> inosina
10 <400> 47
cttagataaa ganttcagga agtata 26
<210> 48
<211> 26
<212> DNA
15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 48
cttagataaa gatttttagga agtata 26
<210> 49
<211> 26
20 <212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 49
cttagataaa gatttttaggc agtata 26
<210> 50
25 <211> 26
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>

<221> característica miscelánea
<222> (20)..(20)
<223> inosina
<400> 50
5 cttagataaa gatttttaggn agtata 26
<210> 51
<211> 28
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
10 <400> 51
ttgctggtga tcccttccat ccttgtgg 28
<210> 52
<211> 28
<212> DNA
15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 52
ttgctggtga tcccttccat ccctgtgg 28
<210> 53
<211> 22
20 <212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 53
ttgctggtga tcctttccat cc 22
<210> 54
25 <211> 22
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 54

ttgctggtga tcccttccat cc 22

<210> 55

<211> 55

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> T7 promotor-cebador

<400> 55

aattttaatac gactcactat agggagattg ctggtgatcc cttccatcct tgtgg 55

10 <210> 56

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

15 <223> promotor T7-cebador

<400> 56

aattttaatac gactcactat agggagattg ctggtgatcc cttccatccc tgtgg 55

<210> 57

<211> 49

20 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> promotor T7-cebador

<400> 57

25 aattttaatac gactcactat agggagattg ctggtgatcc tttccatcc 49

<210> 58

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial
<220>
<223> T7 promotor-cebador
<400> 58
5 aatttaatac gactcactat agggagattg ctggtgatcc cttccatcc 49
<210> 59
<211> 22
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
10 <400> 59
ttgctggtga tccyttccat cc 22
<210> 60
<211> 28
<212> DNA
15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<400> 60
ttgctggtga tccyttccat ccytgtgg 28
<210> 61
<211> 26
20 <212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (13)..(13)
25 <223> posición ocupada por T o I (inosina)
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (20)..(20)

<223> posición ocupada por A, C o I (inosina)
 <400> 61
 cttagataaa ganttyaggn agtata 26
 <210> 62
 5 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
 <220>
 <221> característica miscelánea
 10 <222> (22)..(22)
 <223> posición ocupada por A, C o I (inosina)
 <400> 62
 aggaagtata ctgcatttac cntacc 26

Reivindicaciones

1. Un método para determinar si una muestra de ensayo contiene al menos uno de los ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2, dicho método comprende los pasos de:

- 5 (a) combinar dicha muestra de ensayo con un par de los cebadores con reactividad cruzada para formar una mezcla de reacción, en el que dicho par de cebadores con reactividad cruzada es capaz de coamplificar ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2 y comprende una primera secuencia de cebador que
10 consiste en el Id. de Sec. N°:14, que comprende opcionalmente una secuencia río arriba que no es complementaria a ningún ácido nucleico de VIH-1 o VIH-2, y una segunda secuencia de cebador que consiste en cualquiera de Id. de Sec. N°:2 o Id. de Sec. N°:7, que comprende opcionalmente
15 una secuencia río arriba que no es complementaria a ningún ácido nucleico de VIH-1 o VIH-2;

 (b) amplificar, en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos in vitro, los ácidos nucleicos presentes en dicha mezcla de reacción del paso (a); y

- 20 (c) detectar en una reacción de hibridación un amplión de VIH-1, un amplicón de VIH-2, o una combinación de ambos amplicones sintetizados en el paso (b), determinando de este modo que dicha muestra de ensayo contiene al menos uno de los ácidos nucleicos de VIH-1 y VIH-2.

- 25 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha reacción de amplificación de ácidos nucleicos in vitro el paso de amplificación, se selecciona de entre el grupo que consiste en una reacción de amplificación mediada por la

transcripción (AMT), una reacción de amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) y una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3. El método de la reivindicación 1, en el que dicha
5 reacción de hibridación en el paso de detección comprende una sonda con reactividad cruzada que hibrida independientemente con dicho amplicón de VIH-1 y a dicho amplicón de VIH-2.

4. El método de la reivindicación 3, en el que dicha
10 reacción de hibridación en el paso de detección además comprende una sonda específica de VIH-1 que hibrida sólo con dicho amplicón de VIH-1 y no con dicho amplicón de VIH-2.

5. El método de la reivindicación 4, en el que una señal positiva que indica hibridación de la sonda con reactividad cruzada junto con la ausencia de una señal positiva
15 que indica hibridación de la sonda específica de VIH-1 indica que dicha muestra de ensayo contiene ácidos nucleicos de VIH-2 y no contiene ácidos nucleicos de VIH-1.

6. El método de la reivindicación 3, que comprende
20 además un paso para la detección en una reacción de hibridación que comprende una sonda específica de VIH-1, dicho amplicón de VIH-1 sin también detectar dicho amplicón de VIH-2, en el que dicha sonda específica de VIH-1 hibrida sólo con dicho amplicón de VIH-1 y no con dicho amplicón de
25 VIH-2.

7. El método de la reivindicación 6, en el que una señal positiva que indica hibridación de la sonda con reactividad cruzada junto con la ausencia de una señal positiva

que indica hibridación de la sonda específica de VIH-1 que indica que dicha muestra de ensayo contiene ácidos nucleicos de VIH-2 y no contiene ácidos nucleicos de VIH-1.

8. El método de la reivindicación 3, en el que dicha
5 sonda con reactividad cruzada está marcada con un marcaje homogéneamente detectable.

9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho marcaje homogéneamente detectable es un marcaje quimioluminiscente.

10 10. El método de la reivindicación 9, en el que dicho paso de detección comprende la detección con un luminómetro.

11. El método de la reivindicación 1, en el que un resultado positivo obtenido en dicho paso de detección no
15 distingue entre dicho amplicón de VIH-1 y dicho amplicón de VIH-2.

12. El método de la reivindicación 1, en el que dicha reacción de amplificación de ácidos nucleicos in vitro en el paso de amplificación es una reacción de amplificación
20 multiplex que puede además amplificar, con una serie de cebadores específicos de diana, al menos un ácido nucleico que es diferente de VIH-1 y VIH-2.

13. El método de la reivindicación 12, en el que dicho al menos un ácido nucleico que es diferente de VIH-1 y VIH-
25 2 se selecciona del grupo que consiste en VHB y VHC.

14. Una composición para amplificar cualquier analito de ácidos nucleicos de VIH-1 y cualquier analito de ácidos nucleicos de VIH-2 que puede estar presente en una muestra

biológica, que comprende:

(a) un primer cebador que consiste de Id. de Sec. N°:14, que comprende opcionalmente una primera secuencia de cebador río arriba que no es complementario a ninguno de
5 dichos ácidos nucleicos de VIH-1 o VIH-2; y

(b) un segundo cebador que consiste en el Id. de Sec. N°:2 o Id. de Sec. N°:7, que comprende opcionalmente una segunda secuencia de cebador río arriba que no es complementario a ninguno de dichos ácidos nucleicos de VIH-1 o
10 VIH-2.

15. La composición de la reivindicación 14, en el que el primer cebador tiene hasta 75 bases de longitud, y en el que el segundo cebador consiste en el Id. de Sec. N°:2.

16. La composición de la reivindicación 14, en el que
15 el primer cebador tiene hasta 75 bases de longitud, y en el que el segundo cebador consiste en el Id. de Sec. N°:7.

17. Una composición para amplificar cualquier analito de ácidos nucleicos de VIH-1 y cualquier analito de ácidos nucleicos de VIH-2 que puede estar presente en una muestra
20 biológica, que comprende:

(a) un primer cebador que consiste en cualquiera de Id. de Sec. N°:13, Id. de Sec. N°:14 o Id. de Sec. N°:15, dicho primer cebador opcionalmente comprende una primera secuencia de cebador río arriba que no es complementaria a
25 ninguno de dichos ácidos nucleicos de VIH-1 o VIH- 2; y

(b) un segundo cebador que consiste en el Id. de Sec. N°:2, que comprende opcionalmente una segunda secuencia de cebador río arriba que no es complementaria a ninguno de

dichos ácidos nucleicos de VIH-1 o VIH-2.

5 **18.** La composición de la reivindicación 17, en el que el primer y segundo cebador son cada uno de hasta 75 bases de longitud, y en el que el primer cebador consiste en el Id. de Sec. N°:13 que comprende opcionalmente la primera secuencia de cebador río arriba que no es complementaria a ninguno de dichos ácidos nucleicos de VIH-1 o VIH- 2.

10 **19.** La composición de la reivindicación 17, en el que el primer y segundo cebador son cada uno de hasta 75 bases de longitud, y en el que el primer cebador consiste en el Id. de Sec. N°:14 que comprende opcionalmente la primera secuencia de cebador río arriba que no es complementaria a ninguno de dichos ácidos nucleicos de VIH-1 o VIH- 2.

15 **20.** La composición de la reivindicación 17, en el que el primer y segundo cebador son cada uno de hasta 75 bases de longitud, y en el que el primer cebador consiste en el Id. de Sec. N°:15 que comprende opcionalmente la primera secuencia de cebador río arriba que no es complementaria a ninguno de dichos ácidos nucleicos de VIH-1 o VIH- 2.

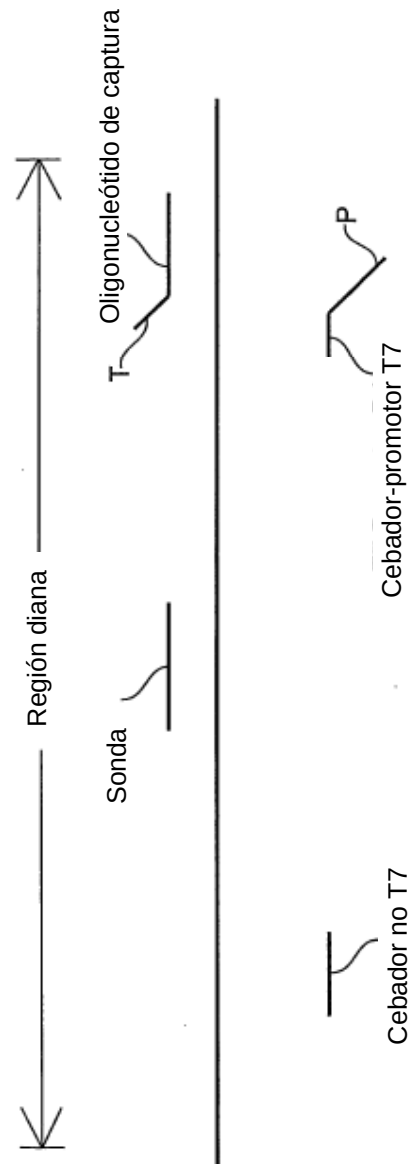


FIG.1