

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0614388-1 A2**

(22) Data de Depósito: 04/08/2006
(43) Data da Publicação: 22/03/2011
(RPI 2098)



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

(54) Título: **ENSAIO, RECIPIENTE DE REAÇÃO PARA REALIZAR O MESMO, KIT E SONDA PARA DETECTAR E TIPIFICAR PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM UMA AMOSTRA**

(30) Prioridade Unionista: 05/08/2005 GB 05 16145.0

(73) Titular(es): Genomica S.A.U.

(72) Inventor(es): Irene Gascón Escobar, María Luisa Villahermosa Jaen

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemens, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT GB2006050231 de 04/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/017699 de 15/02/2007

(57) Resumo: ENSAIO, RECIPIENTE DE REAÇÃO PARA REALIZAR O MESMO, KIT E SONDA PARA DETECTAR E TIPIFICAR PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM UMA AMOSTRA. A presente invenção refere-se a um método e um kit para detecção e tipificação de HPV em uma amostra, tal como um recipiente de reação para uso no método. Iniciadores de HPV universais são usados para amplificar uma amostra por PCR; a amostra amplificada é depois hibridizada a uma série de sondas específicas para tipos de HPV para determinar o tipo de HPV.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ENSAIO, RECIPIENTE DE REAÇÃO PARA REALIZAR O MESMO, KIT E SONDA PARA DETECTAR E TIPIFICAR PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM UMA AMOSTRA"**.

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um kit de diagnóstico *in vitro* e a um método para identificação de Papilomavírus Humano (HPV) em amostras clínicas. A invenção também se refere a aparelhos para uso no kit e no método.

10 Mais especificamente, em modalidades preferidas, a presente invenção refere-se a um kit de diagnóstico *in vitro* para a detecção específica de genótipos de papilomavírus humano em amostras clínicas, usando sondas para determinar o genótipo do HPV, uma plataforma, na qual são combinados uma série de ácidos nucleicos, incluindo as sondas, e um recipiente de reação de laboratório normal, um dispositivo para processamento auto-
15 mático dos resultados e um método para diagnóstico de infecção de HPV usando o kit de diagnóstico *in vitro*.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Até o presente, em torno de 100 tipos de Papilomavírus Humano (HPV) foram descritos. Um tipo de HPV é considerado um tipo novo, quando
20 pelo menos 10% das seqüências de genes nas regiões E6, E7 e L1 do HPV diferem de qualquer outro tipo previamente conhecido. Subtipos ou variantes, diferem do tipo principal em menos de 2-5%. Esses vírus têm tropismo para epitélio humano e têm sido associados a doenças humanas graves, especialmente, carcinomas da mucosa genital e oral.

25 Cerca de 50 tipos de HPV foram isolados da mucosa ano-genital. Os mesmos foram divididos em tipos de baixo risco (por exemplo, tipos de HPV 6, 11, 42, 43 e 44) e tipos de alto risco (por exemplo, tipos 16, 18, 31, 33 e 45), dependendo de sua associação com câncer cervical. A detecção e identificação de tipos de HPV é muito importante, uma vez que uma
30 infecção persistente com tipos de HPV de alto risco é o principal fator etiológico para câncer cervical.

A detecção e identificação de genótipos de HPV é realizada por

teste de DNA de HPV. Esses métodos podem ser feitos por detecção direta de DNA de HPV ou por detecção de DNA de HPV amplificado. Entre métodos para detecção direta de DNA de HPV está o método de Captura Híbrida (HC) de Digene Corp., Gaithersburg, Md, USA e técnicas de hibridização *in situ*. O HC é uma técnica aprovada pelo FDA, baseada em um método de hibridização amplificador de sinais. As sondas de hibridização que são usadas são seqüências de RNA específicas para HPV. Após a incubação dessas sondas com DNA de HPV desnaturado da amostra clínica, são formados híbridos de RNA/DNA, que podem ser detectados usando um anticorpo específico. O método de HC permite diferenciação entre tipos de HPV de alto e de baixo risco, mas não consegue identificar o tipo de HPV. Uma desvantagem adicional desse método de teste é que o uso de um coquetel de sondas freqüentemente resulta em reações cruzadas entre tipos de HPV das duas classes.

Métodos de identificação do tipo de HPV por meio da amplificação do genoma viral são realizados, principalmente, por reação em cadeia de polimerase (PCR). Determinação do genótipo de HPV pode ser feita por PCR específica para tipo, usando iniciadores que reconhecem apenas um tipo específico. Um método alternativo é o uso de PCR de iniciador universal para amplificação de todos os tipos de HPV. Os papilomavírus são tipificados analisando, subsequente, a seqüência do fragmento de gene amplificado. A análise dessa seqüência pode ser realizada por diferentes métodos, tais como seqüenciação de DNA, polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RFLP) ou hibridização de ácido nucléico. Técnicas de hibridização, tal como hibridização de **blot** inversa, foram consideradas as mais apropriadas para fins de diagnóstico (Kleter et al., J Clin Microbiol. 1999, 37:2508-2517; Van den Brule et al. J Clin Microbiol. 2002, 40:779-787).

Recentemente, foi desenvolvida a tecnologia de microordenação (veja, por exemplo, a Patente U.S. Nº 5.455.934). O termo microordenação pretende indicar a análise de muitos pontos pequenos, para facilitar a análise de ácido nucléico em grande escala, possibilitando a análise simultânea

de milhares de seqüências de DNA. Tal como é conhecido na técnica, **blotting** inverso normalmente é realizado em membranas, enquanto microordenação normalmente é realizada em um suporte sólido e também pode ser realizada em escala menor. A tecnologia de microordenação tem sido aplicada, com sucesso, à área de diagnóstico de HPV (veja Publicações de Patente WO 0168915 e Nº CA2484681).

No entanto, ainda existe uma desvantagem no uso de tecnologia de microordenação, de que são necessários equipamento dispendioso e manuseio trabalhoso. Esse inconveniente é abordado pelo Pedido de Patente Nº US2005064469, onde um 'tubo de ordenação' é posto à disposição. O termo 'tubo de ordenação' descreve um recipiente de reação, que tem um formato e um tamanho típicos de um recipiente de reação de laboratório (por exemplo, um tubo Eppendorf de 1,5 ml), com uma microordenação disposta em sua base, na qual testes baseados em microordenação podem ser realizados.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

Em vista do descrito acima, é um objetivo da presente invenção pôr à disposição um método confiável para identificação específica de tipos de HPV, possivelmente presentes em uma amostra clínica.

É mais particularmente um objetivo da presente invenção pôr à disposição um método para identificação específica de tipos de HPV usando a plataforma de 'tubo de ordenação'.

Também é um objetivo da presente invenção pôr à disposição sondas para detecção específica e/ou identificação de diferentes tipos de HPV.

É ainda um objetivo da presente invenção pôr à disposição um kit para detecção e/ou identificação de tipos de HPV, que compreende reagentes, protocolos e sondas específicas para HPV dispostas em um 'tubo de ordenação', possibilitando a detecção específica, confiável, e/ou identificação de tipos de HPV possivelmente presentes em uma amostra clínica.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com um primeiro aspecto da invenção, é posto à dis-

posição um teste para detectar e tipificar um papilomavírus humano (HPV) em uma amostra, sendo que o teste compreende: realizar uma reação de amplificação em uma amostra, sendo que a reação de amplificação destina-se a amplificar uma seqüência alvo de HPV em uma maneira não específica para tipo; obter oligonucleotídeos de filamento simples de quaisquer produtos de amplificação; deixar que oligonucleotídeos de filamento simples se hibridizem, quando possível, com a pluralidade de sondas específicas para tipos de HPV, previstas em um suporte sólido, sendo que o suporte está localizado dentro de um recipiente de reação apropriado para conter a amostra; e detectar oligonucleotídeos hibridizados.

Aspectos da invenção também põem à disposição um teste para detectar e tipificar o vírus de papilomavírus humano (HPM) em uma amostra, sendo que o teste compreende: realizar uma reação de amplificação de ácido nucléico em uma amostra, sendo que a amostra está em contato com um suporte sólido, com uma pluralidade de sondas específicas para tipos de HPV imobilizadas sobre o mesmo, sendo que a reação de amplificação destina-se a amplificar uma seqüência alvo de HPV em uma maneira não específica para tipo; obter oligonucleotídeos de filamento simples de quaisquer produtos de amplificação; deixar que oligonucleotídeos de filamento simples se hibridizem, quando possível, com a pluralidade de sondas específicas para tipos de HPV; e detectar oligonucleotídeos hibridizados.

A reação de amplificação é, de preferência, PCR. Oligonucleotídeos de filamento simples podem ser obtidos desnaturando quaisquer oligonucleotídeos de filamento duplo presentes, por exemplo, por aquecimento. Oligonucleotídeos de filamento simples são deixadas hibridizar-se, de preferência, sob condições rígidas; essas condições são entendidas dos que são versados na técnica, mas, de preferência, incluem incubar oligonucleotídeos desnaturados a 55°C com o alvo, em um tampão que compreende 1 x SSC.

Em modalidades preferidas, a amostra e o suporte sólido estão contidos em um recipiente de reação; por exemplo, o descrito no documento US 2005064469.

De preferência, são usadas sondas específicas para pelo menos

os tipos de HPV 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ou 42, que são escolhidos, de preferência, dos tipos de HPV 6, 11, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34/64, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85 e 89. As sondas têm, convenientemente, 20 a 40 nt de comprimento, de modo particularmente preferido, 28 a 32 nt, e, de modo especialmente preferido, em torno de 30 nt. Nem todas as amostras precisam ser do mesmo comprimento. As sondas são convenientemente específicas para a região L1 de HPV. Cada sonda específica para tipo pode diferir de sondas específicas para outro tipo de HPV em pelo menos 1, 2, 3 ou, de preferência, mais do que 3 nt. Sondas preferidas são escolhidas do grupo que compreende SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 133; diversas dessas sondas detectam o mesmo tipo de HPV, tal como descrito abaixo. De preferência, uma pluralidade de sondas é específica para o mesmo tipo de HPV, e, de modo particularmente preferido, são usadas pelo menos duas sondas específicas para cada tipo de HPV a ser detectado. Misturas dessas sondas podem estar imobilizadas no mesmo local no suporte sólido, ou cada sonda específica para tipo pode estar imobilizada em um local diferente. Cada sonda específica para o mesmo tipo de HPV, de preferência, detecta uma parte diferente da sequência alvo de HPV.

20 As sondas podem ser duplicadas no suporte sólido, para obter locais de detecção múltiplos para redundância.

Uma ou mais sequências de controle também podem ser detectadas; por exemplo, uma sonda imobilizada no suporte sólido, que não se hibridiza na sequência alvo de qualquer tipo de HPV. A sonda pode ser para uma sequência alvo genômica humana; o teste pode então compreender 25 amplificar a sequência alvo humana da amostra e detectar se ocorreu a amplificação. Um outro controle pode ser introduzido usando sequências marcadas não especificamente, imobilizadas no suporte sólido; a detecção da marcação pode garantir que a marcação está funcionando adequadamente. 30 Ainda um outro controle pode ser obtido, incluindo uma sequência de amplificação de controle, que pode ser amplificada pelos mesmos iniciadores como o alvo humano, mas que é detectada por um oligonucleotídeo diferente

no suporte sólido. Esse controle garante que a amplificação está funcionando corretamente.

A invenção também põe à disposição um recipiente de reação que inclui um suporte sólido, com uma pluralidade de sondas específicas para tipos de HPV imobilizada sobre o mesmo. Também está previsto um kit para a detecção e tipificação de HPV, que compreende esse recipiente de reação, em combinação com uma mistura de amplificação de ácido nucléico. A mistura pode compreender iniciadores de consenso de HPV, tais como MY09 e MY11; e, opcionalmente, HMB01; iniciadores para amplificar uma sequência alvo humana; e uma sequência alvo de amplificação de controle, que inclui seqüências correspondentes a partes flanqueadoras da sequência alvo humana, de modo que a amplificação das duas seqüências alvo ocorre usando os mesmos iniciadores. O kit também pode incluir instruções para seu uso.

15 DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

A figura 1 mostra uma disposição de sondas na superfície de uma microordenação com $12 \times 11 = 132$ locais. Os números correspondem ao SEQ ID NO da lista de seqüências. Sondas individuais foram fixadas em dois locais diferentes, para detecção de 21 tipos de HPV diferentes, controle de qualidade da amostra de DNA, e controle de amplificação. LR = sondas para referência de local (SEQ ID NO 140 + SEQ ID NO 141).

A figura 2 mostra uma disposição de sondas na superfície de uma microordenação com $12 \times 11 = 132$ locais. Os números correspondem ao SEQ ID NO da lista de seqüências. Sondas individuais ou misturas de sondas foram fixadas em dois locais diferentes, para detecção de 23 tipos de HPV diferentes, controle de qualidade da amostra de DNA, e controle de amplificação. LR = sondas para referência de local (SEQ ID NO 140 + SEQ ID NO 141).

A figura 3 mostra uma disposição de sondas na superfície de uma microordenação com $12 \times 11 = 132$ locais. Os números correspondem ao SEQ ID NO da lista de seqüências. Misturas de sondas foram fixadas em dois locais diferentes, para detecção de 42 tipos de HPV diferentes e contro-

le de qualidade da amostra de DNA. LR = sondas para referência de local (SEQ ID NO 140 + SEQ ID NO 141); M1 = SEQ ID NO 76 + SEQ ID NO 77 + SEQ ID NO 78; M2 = SEQ ID NO 122 + SEQ ID NO 123 + SEQ ID NO 124; M3 = SEQ ID NO 116 + SEQ ID NO 117 + SEQ ID NO 118 + SEQ ID NO 119.

A figura 4 mostra uma disposição de sondas na superfície de uma microordenação com $12 \times 10 = 120$ locais. Os números correspondem ao SEQ ID NO da lista de seqüências. Sondagens individuais ou misturas de sondas foram fixadas em três locais diferentes, para detecção de 35 tipos de HPV diferentes, controle de qualidade da amostra de DNA e controle de amplificação. LR = sondas para referência de local (SEQ ID NO 140 + SEQ ID NO 141); M1 = SEQ ID NO 76 + SEQ ID NO 77 + SEQ ID NO 78; M2 = SEQ ID NO 122 + SEQ ID NO 123 + SEQ ID NO 124.

A figura 5 mostra uma disposição de sondas na superfície de uma microordenação com $12 \times 10 = 120$ locais. Os números correspondem ao SEQ ID NO da lista de seqüências. Sondagens individuais ou misturas de sondas foram fixadas em dois locais diferentes, para detecção de 14 tipos de HPV diferentes, controle de qualidade da amostra de DNA e controle de amplificação. LR = sondas para referência de local (SEQ ID NO 140 + SEQ ID NO 141); M4 = SEQ ID NO 100 + SEQ ID NO 101 + SEQ ID NO 102.

A figura 6 mostra uma representação esquemática de um plasmídeo recombinante pPG44 usado na reação de PCR como controle positivo de amplificação.

A Figura 7 mostra uma fotografia de um 'tubo de ordenação' usado na presente invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O método para detecção específica e/ou identificação de tipos de HPV compreende as seguintes etapas:

(I) Amplificação do DNA de amostra: DNA obtido de amostras clínicas é amplificado, de preferência, por PCR, usando iniciadores universais para todos os tipos conhecidos de HPV que flanqueiam uma região de genoma suficientemente variável para permitir uma determinação de genóti-

po adicional. Embora PCR seja o método de amplificação preferido, a amplificação das seqüências alvo em uma amostra pode ser realizada por qualquer outro método conhecido na técnica (reação em cadeia de ligase, sistema de amplificação baseado em transcrição, amplificação de deslocamento de filamento etc.). Em uma modalidade da presente invenção foram usados os iniciadores MY11 e MY09 (Manos et al., Molecular Diagnostics of Human Cancer; Furth M, Greaves MF, eds.; Cold Spring Harbor Press, 1989, vol. 7:209-214, que amplificam a região L1 variável.

Uma marcação é introduzida no DNA amplificado durante sua amplificação, para permitir detecção adicional, de preferência, uma marcação que fornece um sinal que pode ser detectado por métodos colorimétricos. Em uma modalidade preferida, pelo menos um dos iniciadores usados está marcado na região do terminal 5' com biotina. Mas, qualquer outro tipo de marcação conhecida na técnica pode ser usada (por exemplo, digoxigenina). Além disso, a marcação de DNA amplificado pode ser obtida, alternativamente, adicionando nucleotídeos modificados que contêm uma marcação (por exemplo derivados de dUTP biotinilados ou marcados com digoxigenina) na mistura de PCR. Em determinadas modalidades, podem ser usadas marcações radiativas, ou fluoróforos.

(II) Hibridização: DNA amplificado da etapa (I) é desnaturado (por exemplo, por calor) e aplicado a um 'tubo de ordenação' com uma ou mais sondas das mostradas na tabela 1 (SEQ ID NO: 1-133). Outros meios para preparar DNA de filamento simples após a amplificação também podem ser usados. Cada sonda mostrada na tabela 1 (SEQ ID NO: 1-133) é capaz de hibridização específica com a região L1 amplificada da etapa (I) de apenas um tipo de HPV e, desse modo, possibilita a identificação específica desse tipo de HPV, quando esse tipo está presente em uma amostra biológica. Os diferentes tipos de HPV em uma amostra podem ser identificados por hibridização de DNA amplificado dos referidos tipos de HPV em uma, mas, de preferência, mais de uma sonda.

(III) Detecção: Híbridos de DNA podem ser detectados por reconhecimento da marcação, pela ligação específica a um ligante ou por imu-

nodetecção. Na modalidade preferida, a marcação de biotina é detectada por ligação específica a estreptavidina, conjugada com peroxidase de armô-
rácia (HRP) e subsequente conversão de tetrametilbenzidina (TMB) em um
5 pigmento azul que se precipita no local onde a sonda específica correspon-
dente foi ligada. Outros tipos de conjugados bem-conhecidos na técnica
também podem ser apropriados para os fins da presente invenção (por e-
xemplo, conjugado de estreptavidina-Au). Sistemas de detecção marcados
de modo fluorescente podem ser usados em vez disso, marcados quer indi-
retamente quer diretamente. Alternativamente, podem ser usados outros
10 sistemas baseados em enzimas.

(IV) Análise e processamento dos resultados: 'tubos de ordena-
ção' processados desse modo podem ser lidos usando dispositivos ópticos
simples, tais como um microscópio óptico ou leitores ATR01 e ATS, produzi-
dos por CLONDIAG Chip Technologies GmbH (Jena, Alemanha).

15 Em uma modalidade alternativa, as etapas de amplificação e
hibridização podem ser realizadas no mesmo tubo de ordenação; isto é, uma
amostra é adicionada ao tubo de ordenação, amostra essa que é depois
amplificada e hibridizada em sondas dentro do tubo.

Um processo para preparar o 'tubo de ordenação' está descrito
20 no Pedido de Patente Nº US2005064469. Em uma modalidade preferida da
presente invenção, sondas de oligonucleotídeos, ligadas em amina de 5',
são ligadas à superfície de um suporte sólido em locais distintos conhecidos.
As referidas sondas podem ser imobilizadas individualmente ou como mistu-
ras em locais delineados no suporte sólido. Em uma modalidade preferida,
25 duas sondas específicas para tipo são usadas para cada tipo de HPV, o que
oferece uma garantia adicional de que todos os HPV serão tipificados corre-
tamente, incluindo variantes, onde ocorreram mudanças de nucleotídeo na
região de uma sonda específica para tipo. De preferência, duas sondas es-
pecíficas para tipo, que são capazes de hibridizar-se em regiões separadas
30 do produto amplificado.

As referidas sondas ou misturas de sondas podem ser imobiliza-
das em um único local do suporte sólido, de preferência, em dos locais dis-

tintos do suporte sólido e, de modo particularmente preferido, em três locais distintos do suporte sólido. As figuras 1 a 5 exemplificam representações esquemáticas para disposições diferentes de sondas na superfície da micro-ordenação.

- 5 O 'tubo de ordenação' usado na presente invenção pode compreender uma ou mais sondas de HPV, escolhidas de seqüência de nucleotídeo da lista de seqüências (SEQ ID NO: 1-133). Além disso, ele pode compreender uma ou mais sondas para detecção específica de controles, tais como controle da reação de PCR ou adequação do DNA do controle de amostras. Além disso, ele também pode compreender um ou mais oligonucleotídeos marcados (por exemplo, oligonucleotídeos modificados com biotina) para controle positivo da reação de detecção e para referência de posicionamento, de modo que todas as sondas restantes podem ser localizadas.

- 15 Sondas específicas para identificação de tipo de HPV foram configuradas tal como se segue. Seqüências para todos os HPVs de referência depositados em GenBank, incluindo variantes conhecidas, para a região L1 amplificada foram alinhadas usando um programa de alinhamento de ácido nucléico convencional, tal como BioEdit (versão 4.8.6; Hall. Nucl Acids Symp Ser. 1999, 41:95-98) e a maioria das regiões de seqüências variáveis entre tipos de HPV diferentes foram localizadas. Seqüências potenciais de oligonucleotídeos a ser usadas como sondas específicas foram escolhidas dessas regiões de seqüências variáveis, de preferência, com as seguintes características: comprimento de 20 a 40 bases, de preferência, um comprimento aproximado de 30 bases, de preferência, sem estruturas secundárias ou cadeias de nucleotídeos iguais consecutivos mais longas do que 4; de preferência, com uma relação de G+C de 50% e um Tm tão similar entre todas as sondas escolhidas quanto possível; e, de preferência, com os nucleotídeos de combinação imperfeita entre as diferentes seqüências de tipos de HPV tão no centro da seqüência de oligonucleotídeos quanto possível.

- 30 Cada seqüência de sonda potencial escolhida tal como mencionado acima foi comparada contra todas as seqüências de HPV conhecidas na região L1 amplificada usando o programa BLAST da página de rede NC-

BI (Altschul et al. Nucleic Acid Res. 1997, 25:3389-3402). Finalmente, sondas com pelo menos três combinações imperfeitas, quando comparadas com todos os tipos de HPV conhecidos (exceto quando comparadas com o tipo de HPV para o qual a sonda de oligonucleotídeo é específica), foram
5 escolhidas, com uma preferência por sondas com mais do que três combinações imperfeitas.

A presente invenção põe à disposição sondas para a detecção específica dos 42 tipos de HPV mais importantes clinicamente: 6, 11, 16, 187, 26, 30, 31, 32, 33, 34/64, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56,
10 57, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85 e 89 (tabela 1; SEQ ID NO 1-133). Sequências de sondas são representadas como oligonucleotídeos de DNA de filamento simples da extremidade 5' até a extremidade 3'. Em uma modalidade preferida da presente invenção, sequências de sondas correspondem ao filamento anti-sentido, mas é óbvio
15 para qualquer um versados na técnica que qualquer uma dessas sondas pode ser usada como tal, ou em sua forma complementar, ou em sua forma de RNA (onde T está substituído por U). As sondas da presente invenção também podem ser preparadas por adição ou mudança de um ou mais nucleotídeos de sua sequência, sem afetar dramaticamente sua funcionalidade.
20 de.

Tabela 1:

SEQ ID NO	Nome da Sonda	Tipo de HPV	Sequência (5' -> 3')
1	6A1-AS	6	TGTATGTGGAAGATGTA GTTACGGATGCAC
2	6B4	6	CATGACGCATGTACTCTTTATAATCAGAATT
3	11A1-AS	11	TGTATGTAGCAGATTTAGACACAGATGCAC
4	11B1	11	CATGGCGCATGTATTCCCTTATAATCTGAAT
5	16A	16	GTAGATATGGCAGCACATAATGACATATTT
6	16E-AS	16	TTCTGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGA
7	16C3	16	CGTCTGCAGTTAAGGTTATTTTGACAGTT
8	16C4	16	CAAAATAGTGAATTCATAGAATGTATGTAT
9	16C5	16	CTATAAGTATCTTCTAGTGTGCCTCCTGGG
10	18A1-AS	18	ATCATATTGCCCAGGTACAGGAGACTGTGT
11	18B3	18	CTTATTTTCAGCCGGTGCAGCATCCTTTT
12	18C2	18	AAGTTCCAATCCTCTAAAATACTGCTATTC
13	18C3	18	TCCTTTAAATCCACATTCCAAAACCTTAACT
14	26A1-AS	26	TGGTTTAAATGGAGTGGATGCAGATGCTGC
15	26B2	26	ATCTTCCTTTGGCACAGGAGGGGCGTTACG
16	26C1	26	CATATTCTTCGCCATGTCTTATAAATTGTT
17	26C3	26	TCCTCCAATATGGAGGCATTCAATTAATGT
18	26C4	26	GATCTTCCTTTGGCACAGGAGGGGCGTTAC
19	30A1	30	CTTGTGGCAGCTGGGGGTGACAAATCCAATA
20	30B1	30	GATAACGTTTGTGTGGTTGCAGATATAGTC
21	30C1	30	TTCCAGCCCTCAAGTAAAGTGGAGTTCATA
22	31A-AS	31	TGTAGTATCACTGTTTGCAATTGCAGCACA
23	31B5	31	AGAACCTGAGGGAGGTGTGGTCAATCCAAA
24	31C2	31	TCAAATTCCTCACCATGTCTTAAATACTCTTTA
25	31C5	31	AAAATAGCAGGATTCATACTGTGAATATATG
26	32A1	32	AGTTAGTAGACTTGTATGTGTCTTCAGTTGTT
27	32B1	32	TTCCCAAATGAATAGTCAGAAAAAGGATC
28	33A2	33	TACTGTCACTAGTTACTTGTGTGCATAAAG
29	33B1-AS	33	GTATATTTACCTAAGGGGTCTTCCTTTTCC
30	33C1	33	AATGTATATTTACCTAAGGGGTCTTCCTTT
31	33C3	33	TTCTGCAGTTAAGGTAACCTTGATAGTTG
32	34/64A1	34/64	ATATGGTGGAGTTGTACTTGTGGATTGTGT
33	34/64B1	34/64	TCCTTAGGAGGTTGCGGACGCTGACATGTA
34	35A1-AS	35	GTCAC TAGAAGACACAGCAGAACACACAGA
35	35B1	35	AATGGATCATCTTTAGGTTTTTGGTGCAC TG
36	35C4	35	TTACATAGCGATATGTGTCTCTAAGGTAC
37	35C7	35	TTTGACAAGTTACAGCCTGTGATGTTACAT
38	39A1-AS	39	GGTATGGAAGACTCTATAGAGGTAGATAATG
39	39B1	39	GTATCTGTAAGTGTCTACCAAAC TGGCAGA
40	39C2	39	TAGAGGTAGATAATGTAAAGTTGGTACTAC

41	39C3d	39	GTAAATCATACTCCTCCACGTGCCTGRTAT
42	39C4	39	CATCAGTTGTTAATGTGACAGTACACAGTT
43	39C4d	39	CATCAGTTGTTAATGTGACAGTACACAGTT
44	40A1-AS	40	CTTGAAATTACTGTTATTATATATGGGGTTGG
45	40B1	40	CCTCCAACACGTAGGATCCATTGCATGAA
46	42A1	42	GTATATGTATCACCAGATGTTGCAGTGGCA
47	42B1-AS	42	TAGCCTGACAGCGAATAGCTTCTGATTGTA
48	42C1	42	TGACAGCGAATAGCTTCTGATTGTACATAC
49	42C5	42	TCCTCTAATATGTTAGGATTCATATTGTGTA
50	42C6	42	TTCTAAAGTTCCTGAAGGTGGTGGTGCAAC
51	43A1	43	ATATGTACTGGGCACAGTAGGGTCAGTAGA
52	43B1-AS	43	AAGCAGAGGCAGGTGGGGACACACCAAAT
53	44A1	44	TATATGTAGACGGAGGGACTGTGTAGTGG
54	44B1-AS	44	CGCATGTATTGCTTATATTGTTCACTAGTAT
55	45B1	45	CTGCTTTTCTGGAGGTGTAGTATCCTTTT
56	45B4-AS	45	GGCACAGGATTTTGTGTAGAGGCACATAAT
57	45C1d	45	TACTATASTGCTTAACTTAGTAGGRTCAT
58	45C3d	45	CCACYAACTTGTAGTAGGTGGTGGAGGKA
59	45C4	45	CAGGTAACAGCAACTGATTGCACAAAACGA
60	51A1-AS	51	TAAATGTTGGGAAACCGCAGCAGTGGCAG
61	51B1	51	TGGAGGGGTGTCCTTTTGACAGCTAGTAGC
62	51C3	51	ATGGTAGGATCCATTGTGTGTAAATAAGCC
63	51C4	51	CCACTGTTCAAGAATGGTAGGATCCATTGT
64	51C5	51	CCAACTAGCAGACGGAGGTAATGTTAATC
65	52A1-AS	52	TTATATGTGCTTTTCCTTTTAACTCAGCA
66	52B2	52	GTGTCCCTCCAAAGATGCAGACGGTGGTGG
67	53A1	53	AACCTCAGCAGACAGGGATATTTTACATAG
68	53B1	53	AAGCTAGTGGCAACAGGAGGCGACAAACCT
69	54A1	54	GCTATCCTGCGTGGATGCTGTAGCACACAA
70	54B1	54	AACTACTTGTAGCTGGGGGGGTATACCAA
71	54C1	54	ATCTGCTGTAAGGGTTATGGTACATAACTG
72	56A1	56	TGTCTAAGGTACTGATTAATTTTCGTGCA
73	56B1	56	TTTATCTTCTAGGCTGGTGGCCACTGGCGG
74	57A1d	57	TATAATTAGTTTCTGTGKTACAGTGGCAC
75	57B1	57	AGTCCCTAGCAACCGCGCATCCATGTTAT
76	58A1	58	ATATTCTTCAACATGACGTACATATTCCTT
77	58B1a	58	TCTTCTTTAGTTACTTCAGTGCATAATGTC
78	58B1b	58	CCTTCCTTAGTTACTTCAGTGCATAATGTC
79	59A2	59	CTGGCATATTCTTTAAACTGGTAGGTGTG
80	59B1-AS	59	TCCTGTTTAACTGGCGGTGCGGTGTCCTTT
81	59C3_3d	59	GAAGVAGTAGTAGAAGCACACACAGAAAGA
82	59C4	59	TTCTCCACATGTCTGGCATATTCTTTAAA
83	59C6	59	GTGGTATTCATATTATGAATGTATGACATT
84	61A1	61	TATATTCAGATACAGGGGGGGATGTAGCAG
85	61B1	61	ATAACTTGCCATAGCGATCCTCCTTGGGCG
86	61B2	61	ATATTCCCTAAAGCTTGTGGCTTTATATTC
87	62A1	62	GTGGAAAGGGGAGGTAAAACCCCAAAGTTC
88	62B1	62	ATACGGGTCCACCTTGGGACGGGTAGGCAG
89	62B2	62	AAATGTCATTTGCGCATACGGGTCCACCTT
90	66A1	66	GTTAATGTGCTTTTAGCTGCATTAATAGTC
91	66B1	66	TGGCGAAGGTATTGATTGATTTACGKGA
92	66B2	66	CACATGGCGAAGGTATTGATTGATTTACAG

93	66C3d	66	CCAATRTTCCAATCGTCTAATAAAGTATTA
94	66C4	66	CTGTGCTTTTAATATACCTATATTTATCCT
95	67A1	67	TCTTCCTTTGCTGTTGGAGGGGATGTTTTT
96	67B1	67	TGGTGTGTATGTATTGCATAACATTTGCAG
97	67B2	67	GTTTTTCATTTTTGTATGTAGCCTCTGATT
98	68A1-AS	68	AGGTGCAGGGGCGTCTTTTGGACATGTAAT
99	68B1	68	AGCGGTATGTATCTACAAGACTAGCAGATG
100	68C4b	68	TACATCAGTTGACAATGTTATAGTACACAAC
101	68C4c	68	TACATCAGTGGATAATGTTATAGTACACAAC
102	68C7	68	CAAGACTAGCAGATGGTGGAGGGGCAACAC
103	69A1	69	ATGGTTTAAAAGTGGCAGATGCAGATTGTG
104	69B1	69	TGTGCAGGGGCGATCGCGTTGACATGTAGTA
105	70A1-AS	70	AAACTTTGTAGGGCTATATACAGCAGGTAT
106	70B1	70	TGGTGGAGGGGTAACTCCTATATTTCCAATT
107	71A1	71	AATATTCCATGAAACTAGAGGCTTTATATG
108	71B1	71	TTTTTCTGCAGGAGGAGGACTGTTTTTCTG
109	72A1	72	TCTGATACAGAGGACGCTGTGGCAGTACAA
110	72B1	72	GTGGCGAAGATACTCACGAAAATTAGAAGC
111	73A1	73	TAGAGTTGGCATAACGTTGTAGTAGAGCTAC
112	73A2	73	GAGTTGGCATACGTTGTAGTAGAGCTACTA
113	73B1	73	AGGAGGTTGAGGACGTTGGCAACTAATAGC
114	73C3	73	TCCACTCTTCCAATATAGTAGAATTCATAG
115	73C4	73	TTCTCTAAAGTACCTGACGGTGGTGGGGT
116	74A1a	74	TTAAATTTGCATAGGGATTGGGCTTTGCTT
117	74A1b	74	TTAAATTGGCATAGGGATTAGGCTTTGCTT
118	74B1a	74	AGCAGAAGGCGATTGTGAGGTAGGAGCACA
119	74B1b	74	AGCAGGAGGGGATTGTGTAGTAGGCGCACA
120	81A1	81	TTCTGCAGCAGCAGATGTAGCTGTGCAAT
121	81B1	81	CTGTCCAAAATGACATGTCGGCATAAGGGT
122	82A2a-AS	82	TGCAACAGATGGAGTAACAGCAGTGTAAAT
123	82A2b-AS	82	TGCAACTGATGGAGTAGCAGCAGTGTAAAT
124	82B1	82	TGTAGAATCCATGGTGTGCAGGTAAGCCAT
125	83A1	83	TTCATTAGCCTGTGTAGCAGCAGCTGAAAT
126	83B1d	83	CACATCATCYAATAAATGTTCAATCATACTAT
127	84A1	84	ATATTCTGATTTCGGTGTGGTAGCAGCACT
128	84B1	84	AAATAGGACATGACCTCTGGAGTCAGACGG
129	85A1	85	ATATAGATGGAACCTGGATTAGTAGTTGCAG
130	85B1	85	CCTTTTTTTGTGGAACAACCACATCCTTCT
131	89A1	89	TCCTTAAAGCGTGTAGAAGTGTATTCTGTG
132	89B1	89	ATCTCAGGCGTTAGGTGTATCTTACATAGT
133	89C1	89	AATGGCCCGAGAGGTAAGAAAGCGATAGGT

Os nucleotídeos das seqüências são designados tal como se segue: G para guanidina, A para adenina, T para timina, C para citosina, R para G ou A, Y para T ou C, M para A ou C, K para G ou T, S para G ou C, W para A ou T, H para A ou C ou T, B para G ou T ou C, V para G ou C ou A, D para G ou A ou T, e, finalmente, N para G ou A ou T ou C. Os nucleotídeos, tais como usados na presente invenção, podem ser ribonucleotídeos, desoxirribonucleotídeos e nucleotídeos modificados, tal como inosina, ou nucleotídeos que contêm grupos modificados que não alteram essencialmente suas características de hibridização.

As sondas da presente invenção podem ser obtidas por métodos diferentes, tais como síntese química (por exemplo, pelo método convencional de fosfotriéster) ou por técnicas de engenharia genética, por exemplo, por clonagem molecular de plasmídios recombinantes, nos quais foram inseridas seqüências de nucleotídeos correspondentes e que podem ser obtidos posteriormente por digestão com nucleases.

Para alguns tipos de HPV, as sondas foram criadas de uma região de seqüência que continha nucleotídeos distintos em uma posição concreta para diferentes variantes do tipo de HPV mencionado. Nesses casos, foram usadas sondas degeneradas, isto é, mistura de oligonucleotídeos, cada um dos quais contém nucleotídeos alternativos na posição mencionada. Esse é o caso das sondas 39C3d [SEQ ID NO 41], 39C4d [SEQ ID NO 43], 45C1d [SEQ ID NO 57], 45C3d [SEQ ID NO 58], 57A1d [SEQ ID NO 74], 59C3_d [SEQ ID NO 81], 66B1 [SEQ ID NO 91], 66C3d [SEQ ID NO 93 e 83B1d [SEQ ID NO 126]. Alternativamente, foram usadas como sondas individuais misturas equimoleculares de dois oligonucleotídeos, compreendendo exatamente a mesma região de seqüência, mas diferente na composição de nucleotídeo para determinadas posições (mistura dos oligonucleotídeos 58B1a [SEQ ID NO 77] e 58B1b [SEQ ID NO 78]; 68C4b [SEQ ID NO 100] e 68C4c [SEQ ID NO 101]; 74A1a [SEQ ID NO 116] e 74A1b [SID117]; 74B1A [SEQ ID NO 118] e 74B1b [SEQ ID NO 119]; E A MISTURA DOS oligonucleotídeos 82A2a-AS [SEQ ID NO 122] e 82A2b-AS [SEQ ID NO 123].

Todas as sondas descritas na presente invenção provaram ser capazes de hibridizar-se especificamente em suas seqüências alvo, sob as mesmas condições de hibridização, na plataforma do 'tubo de ordenação'. Esse fato torna possível o uso dessas sondas para a identificação simultânea de 42 tipos diferentes de HPV usando essa plataforma de microordenação. O alto número de tipos de HPV identificado pelo uso do 'tubo de ordenação' desenvolvido na presente invenção faz com que essa metodologia também seja considerada como um método de detecção direta, uma vez que os tipos de HPV restantes são clinicamente irrelevantes.

Um dos pontos fracos dos métodos de diagnóstico é a ocorrên-

cia de falsos negativos. No caso do presente método, falsos negativo podem ser causados pela qualidade deficiente das amostras de DNA ou pela presença de inibidores de polimerase de DNA nas amostras a ser analisada. A presente invenção ilustra o meio para eliminar esses falsos negativos através do uso de dois tipos de controles.

Um controle, que consiste na amplificação do DNA do próprio paciente é usado, de preferência, para garantir a boa qualidade da amostra de DNA. Qualquer fragmento de seqüência de DNA humano pode ser usado como alvo para esse fim. Um fragmento de um gene de cópia único, tal como o gene de CFTR, foi considerado um alvo especialmente apropriado para controle positivo da qualidade de DNA na presente invenção. Os iniciadores CFTR-FR (SEQ ID NO 134) e CFTR-R5 (SEQ ID NO 135) foram criados para amplificação de um fragmento de 892 bp do gene de CFTR. O uso de um alvo de cópia único *versus* um alvo de cópia múltiplo e o tamanho maior do produto amplificado de controle de qualidade de DNA, comparado com o fragmento amplificado de HPV, isto é, em cada caso, 892 bp *versus* em torno de 450 bp, permitiu a inclusão de iniciadores para a amplificação de CFTR na mesma mistura de reação da que é usada para a amplificação da região L1 do genoma de HPV, com efeitos de concorrência mínimos. Portanto, o controle de qualidade de DNA pode ser executado simultaneamente no mesmo tubo de reação, onde a amostra é analisada, sem afetar a sensibilidade para detecção de HPV.

Um segundo controle pode ser usado como controle positivo de amplificação, que detecta falhas na reação de PCR, devidas, por exemplo, à presença de inibidores de polimerase de DNA. Em uma modalidade preferida, o controle positivo de amplificação consiste em um plasmídio recombinante que pode ser amplificado usando os mesmos iniciadores e as mesmas condições de PCR como os usados para amplificação do fragmento de gene de CFTR. Tanto o tamanho como a seqüência interna aos iniciadores são diferentes entre produtos de PCR resultantes da amplificação do gene de CFTR e da amplificação de plasmídio recombinante. Desse modo, os dois tipos de produtos de amplificação podem ser facilmente distinguidos por

meio de eletroforese de gel ou por meio de hibridização com sondas específicas. A figura 6 mostra uma representação esquemática do plasmídio recombinante pPG44 com essas características.

O plasmídio pPG44 foi construído por técnicas de clonagem molecular. Em resumo, uma inserção de DNA, constituída do fragmento de 1162 bp da posição 124 para a posição 1285 do vetor pBluescript® II SK + (Stratagene, La Jolla, CA, USA), flanqueado pelos iniciadores de CFTR, CFTR-4 e CFTR-R5, foi clonado do pGEM®-T Easy Vector, usando o kit obtível comercialmente da Promega Corporation, Madison, WI, USA. Uma preparação purificada do plasmídio recombinante pPG44 obtido foi caracterizada, ainda, pelo uso de enzimas de restrição e por análise de seqüência. O plasmídio pPG44 foi usado como controle positivo do processo de amplificação em uma forma linearizada.

A presença de um controle positivo, tal como o plasmídio recombinante mencionado, na mesma mistura de amplificação de PCR onde a amostra é analisada, evita a ocorrência de resultados negativos falsos, isto é, evita que um resultado negativo seja dado, mesmo na presença do genoma de HPV-alvo na amostra, porque, quando nenhum dos produtos de amplificação é gerado, é preciso presumir que a amplificação de PCR não funcionou corretamente e pode-se chegar a uma conclusão quanto à presença ou ausência do genoma de HPV na amostra.

Sondas para a detecção específica dos dois tipos de controles positivos descritos, isto é o controle de qualidade de DNA e o controle da reação de amplificação, são apresentadas na tabela 2 (SEQ ID NO 136-139 e SEQ ID NO 145-147). Seqüências de oligonucleotídeo sem homologia significativa a qualquer um dos produtos amplificados da presente invenção, também são apresentados nessa tabela 2 (SEQ ID NO 140-141). Quando imobilizados na superfície da microordenação, os oligonucleotídeos modificados com biotina SEQ ID NO 140 e SEQ ID NO 141 servem como controle positivo da reação de detecção de produtos de PCR e como uma referência de posicionamento, de modo que todas as sondas restantes podem ser localizadas.

Tabela 2:

SEQ ID NO	Noma da sonda	Tipo de controle	Sequência (5' - 3')
136	CFTR-A1-AS	Qualidade de amostra de DNA	TTCTCCACCCACTACGCACCCCGCCAGCA
137	CFTR-B3	Qualidade de amostra de DNA	GGGCTCAAGCTCCTAATGCCAAAGACCTACTACTG
145	CFTR-B1-AS	Qualidade de amostra de DNA	CAAGCTCCTAATGCCAAAGACCTACTACTC
146	CFTR-B2	Qualidade de amostra de DNA	GGGCTCAAGCTCCTAATGCCAAAGACCTACTACTC
138	CIA1-AS	Redução de PCR	CTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTAT
139	CIA2-AS	Redução de PCR	TCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATG
147	CIA3-AS	Redução de PCR	GAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGAC
140	Marker-1	Deteção & locação	GCAGTATAAGATTATTGATGCCGGAAC
141	Marker-2	Deteção & locação	GTCAAPACCTGGGATAGTAGTTTACC

A presente invenção também se refere a um kit de diagnóstico *in vitro* para a detecção específica de tipos de HPV em amostras clínicas. De preferência, o kit mencionado inclui qualquer um ou dos os seguintes componentes: mistura de amplificação, incluindo tampão de amplificação, dNTPs, iniciadores e plasmídeo de controle; tampão de lavagem; reagentes de detecção; tubo de ordenação, incluindo um suporte sólido, que inclui sondas específicas para tipos de HPC; reagentes para obter e preparar uma amostra. Os componentes específicos dependem das condições exatas sob as quais o kit pretende ser usado, embora a pessoa versada na técnica seja capaz de determinar componentes de kit e composições de tampão apropriados.

EXEMPLOS

Os exemplos apresentados abaixo apenas ilustram a invenção e de modo algum limitam o alcance das reivindicações anexas.

EXEMPLO 1: Preparação de 'tubos de ordenação'

Os 'tubos de ordenação' da presente invenção foram fabricados na CLONDIAG Chip Technologies GmbH (Jena, Alemanha), do seguinte modo. Um tubo de teste de reação de Eppendorf normal, feito de propileno e com um volume de recepção nominal de 1,5 ml, foi modificado por nova fusão, de modo que uma reentrância aberta para o suporte de microordenação com uma borda adesiva foi modelado no tubo.

Microordenações a ser inseridas nesses tubos foram produzidas usando um MicroGrid II Arrayer (BioRobotics, Cambridge, Grã-Bretanha). Sondas constituídas de oligonucleotídeos modificados com amino de extre-

midade 5', com uma seqüência da lista de seqüências, foram depositadas em locais definidos sobre uma superfície de vidro epoxidada de uma lâmina (tamanho da lâmina: 75 mm x 25 mm) e imobilizadas de modo covalente. Uma microordenação individual incluía $12 \times 10 = 120$ ou $12 \times 11 = 132$ locais concretos, nos quais os oligonucleotídeos podiam ser depositados. Esses locais têm um distanciamento de 0,2 mm, de modo que a coleção de DNA incluída em cada microordenação cobria uma área de 2,4 mm x 2,4 mm e, no total, mais de 100 coleções de DNA idêntica puderam ser produzidas dessa maneira por lâmina. Dependendo do tipo da experiência, uma sonda individual ou uma mistura das mesmas puderam ser depositadas em cada um desses locais. Normalmente, sondas individuais foram depositadas em cada local, quando eram realizadas experiências de especificidade e sensibilidade para seleção de sondas. Quando as sondas foram validadas, misturas de sondas capazes de hibridizar-se em regiões separadas do produto amplificado de um tipo de HPV específico puderam ser depositadas no mesmo local, quando eram realizados testes de identificação de genótipos de HPV. As figuras 1 a 5 mostram disposições diferentes de sondas dentro de microordenações usadas para esta invenção. Duas ou três réplicas para cada sonda ou mistura de sondas foram incluídas em cada microordenação.

Além de sondas específicas para determinação de genótipo de HPV e para detecção de controle de amplificação e adequação de controle de DNA. As microordenações incluíram marcadores de referência em diversos locais, constituídos de oligonucleotídeos modificados com biotina na extremidade 5' (Marcador-1 [SEQ ID NO 140] e Marcador-2 [SEQ ID NO 141]), sem homologia significativa para qualquer uma das seqüências amplificadas desta invenção. Esses marcadores de referência servem tanto para verificar o funcionamento correto da reação de detecção como para orientação óptica da imagem pela leitora, de modo que todas as sondas restantes podem ser localizadas e os dados analisados.

Todos os oligonucleotídeos foram depositados na lâmina de uma 1x QMT Spotting Solution I (Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Alemanha). Concentração total de oligonucleotídeos em cada solução de localização

variou de 2,5 μ M para marcadores de referência a 20 μ M para sondas específicas. Os oligonucleotídeos foram depois ligados de modo covalente aos grupos epóxido na superfície de vidro por endurecimento a 60°C por 30 minutos, seguido de um processo de lavagem de etapas múltiplas. As lâminas secas foram cortadas em pedaços de vidro de 3,15 mm x 3,15 mm, o que, falando precisamente, são o que chamamos de microordenações. Na etapa final da produção de 'tubos de ordenação', essas microordenações foram depois inseridas nos tubos Eppendorf modificados, mencionados acima, e coladas na borda adesiva. A figura 7 mostra uma fotografia de um "tubo de ordenação" produzido tal como especificado no presente exemplo.

EXEMPLO 2: Preparação de amostras de DNA

2.1. DNAs de HPV padrão

DNAs de HPV usados para determinar a especificidade e sensibilidade das sondas específicas para tipo eram plasmídios recombinantes contendo a região L1 amplificada (tipos de HPV 6, 11, 16, 187, 26, 30, 31, 32, 33, 34/64, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85 e 89) ou DNAs extraídos de amostras clínicas, região L1 amplificada que foi caracterizada, ainda, por seqüenciação de DNA. Plasmídios recombinantes foram construídos por técnicas de clonagem molecular. Em resumo, a região L1 amplificada de cada tipo de HPV foi clonada em pGEM®-T Easy Vector, usando o kit obtível comercialmente de Promega Corporation, Madison, WI, USA. Uma preparação purificada obtida de cada plasmídio recombinante foi caracterizada, ainda, por análise de seqüência. De 1 a 10 pg de DNA de plasmídio foram usados na determinação de experiências de especificidade.

DNA da linha de células K562 (Catálogo No DD2011, Promega Corporation, Madison, WI, USA) serviu para determinar a especificidade e sensibilidade de sondas específicas para CFTR.

2.2. Amostras clínicas

Para o fim de detectar HPV, primeiramente é necessário separar DNA do material biológico restante. A preparação de procedimentos de DNA varia de acordo com a fonte da amostra. São apresentados exemplos espe-

cíficos da preparação de DNA de amostras de uma pluralidade de fontes:

A. Mechas: amostras foram tiradas com uma mecha de algodão limpa, seca. Células de mechas clínicas foram recuperadas pela adição de 1,5 ml de solução salina diretamente ao recipiente com a amostra e vigorosa
5 agitação por vórtice. Material de amostra foi transferido para um tubo Eppendorf de 1,5 ml e peletizado por centrifugação. O material flutuante foi descartado e as células precipitadas foram suspensas em 100 µl de tampão de lise, que contém 10 mM de Tris-HCl (pH 9,0, a 25°C), 50 mM de KCl, 0,15 mM de MgCl₂, 0,1% de Triton®X-100, 0,5% de Tween 20 e 0,25 mg/ml de
10 Proteinase K. Essa mistura foi incubada a 56°C por cerca de 2 horas, e a proteinase K por inativada termicamente por incubação da mistura a 100°C por 10 minutos. Os detritos foram peletizados por centrifugação e o material flutuante foi transferido para um tubo limpo e estéril. Uma alíquota de 5 µl foi usada subsequente na reação de PCR.

15 B. Suspensões de células: esse tipo de amostra refere-se à usada em testes de citologia baseados em líquido cervico-vaginal. Espécimes cervicais foram tirados com uma escova ou espátula e ressuspensos em solução de PreservCyt (Cytoc Corp., Marlborough, MA, USA). Uma alíquota de 1 ml foi centrifugada e o material peletizado foi ressuspenso em 1 ml de
20 solução salina. Depois de uma nova etapa de centrifugação, o material peletizado foi ressuspenso em 199 µl de tampão de lise, tal como o usado com as amostras de mechas no parágrafo A e o protocolo foi continuado da mesma maneira como naquela seção.

C. Biópsias fixadas em formalina e embutidas em parafina: di-
25 versas seções de tecido de 5 µm de largura foram usadas no presente método, tipicamente, 2-5 seções, dependendo da área superficial da biópsia. As seções foram postas em um tubo estéril de 1,5 ml e 100 µl de tampão de lise, tal como o usado com as amostras de mecha no parágrafo A foram adicionados. O protocolo foi continuado da mesma maneira como naquela se-
30 ção, exceto que a incubação com Proteinase K foi realizada por 3 horas.

Alternativamente, um kit comercial (NucleoSpin® Tissue kit Catálogo No. 635966 de BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA), criado

para isolamento de DNA de amostras de uma pluralidade de fontes, foi usado para processar amostras de mechas, suspensões de células ou biópsias fixadas com formalina e embutidas em parafina. Nesse caso, o início do protocolo de isolamento de DNA foi tal como especificado nas seções A, B e c. Em
5 vez de 100 µl de tampão de lise, foram adicionados à amostra 180 µl de tampão T1. O protocolo foi continuado seguindo especificações do fabricante para isolamento de DNA genômico de células e tecido.

Qualquer que seja o tipo de amostra clínica ou de método de preparação de DNA, controles negativos foram executados paralelamente a
10 cada lote de amostras. Esses controles negativos, constituídos de 1 ml de solução salina, foram processados da mesma maneira como na seção A.

EXEMPLO 3: Amplificação de PCR

A amplificação de PCR usando iniciadores de consenso MY 11 e MY9 (Manos et al., Molecular Diagnostics of Human Cancer; Furth M, Greaves MF, eds.; Cold Spring Harbor Press, 1989, vol. 7:209-214). Um terceiro
15 iniciador, HMB01, que é usado freqüentemente em combinação com MY09 e MY11 para amplificar o tipo 51 de HPV, que não é amplificado eficientemente com MY09 e MY11 sozinhos (Hildesheim et al., J Infect Dis. 1994, 169:235-240), também foi incluído na reação de PCR. Em resumo, a amplificação de PCR foi realizada em um volume de reação final de 50 µl, contendo 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, 0,3 µM de
20 cada um dos iniciadores MY09 e MY11 (SEQ ID NO 142 e 143), 0,03 µM de iniciador HMB01 (SEQ ID NO 144), 200 µM de cada dNTP, 4 unidades de polimerase de DNA AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), e 5 µl de cada padrão e DNA de HPV do exemplo 2.1, ou DNA de
25 amostra clínica do exemplo 2.2. Para testar a adequabilidade do DNA de amostra, 0,08 µM de cada uma dos iniciadores CFTR-F4 e CFTR-R5 (SEQ ID NO 134 e 135) também foram adicionados à mistura de reação. Além disso, para verificar o processo de amplificação e eliminar resultados negativos falsos devido à falha da reação, 20 fg de controle interno pPG44 foram inclu-
30 ídos no mesmo tubo de reação no qual as amostras foram analisadas. Todos os iniciadores acima usados na reação de PCR (MY11 [SEQ ID NO 143]

e CFTR-F4 [SEQ ID NO 134] foram modificados com biotina na extremidade 5' e, desse modo, qualquer DNA amplificado pôde ser subsequente detectado.

Controles negativos constituídos de amostras vazias de 5 µl do exemplo 2.2. ou 5 µl de água deionizada foram processados em paralelo com o DNA de amostra. O uso desses tipos de controles negativos serve para verificar que a contaminação não ocorre em nenhum ponto no manuseio da amostra ou na configuração da reação de PCR e todos os resultados positivos representam a eficaz presença de DNA na amostra.

As reações de PCR foram executadas em um termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), programado com o seguinte perfil de ciclicização: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 9 minutos, 45 ciclos de 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 55°C e 90 segundos a 72°C, e um ciclo de extensão final a 72°C por 8 minutos. Após a amplificação, 5 µl de cada reação foram usados para detecção subsequente com sondas específicas.

EXEMPLO 4: Identificação simultânea de genótipos de HPV usando 'tubos de ordenação'

'Tubos de ordenação' foram pré-lavados logo antes de seu uso pela adição de 300 µl de 0,5X de tampão PBS-Tween 20 a cada tubo e invertendo os mesmos diversas vezes. Todo o líquido dentro de cada tubo foi removido usando uma pipeta Pasteur ligada com um sistema a vácuo.

As reações de amplificação do exemplo 3 foram desnaturadas por aquecimento das mesmas para 95°C por 10 minutos e, imediatamente depois, resfriando as mesmas por 5 minutos sobre gelo. Cinco microlitros de reação de amplificação desnaturada foram aplicados ao 'tubo de ordenação' preparado no exemplo, junto com 100 µl de solução de hibridização (250 mM de tampão de fosfato de sódio, pH 7,2; SSC 1X; 0,2% de Triton® X-100; 1 mM de EDTA, pH 8,0). A reação de hibridização foi realizada em um Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) incubando os 'tubos de ordenação' a 55°C por uma hora com agitação a 550 rpm. Após o período de incubação, a reação de hibridização foi removida usando uma

pipeta Pasteur ligada com um sistema a vácuo e uma etapa de lavagem com 300 µl de tampão de 0,5X PBS-Tween 20 foi realizada.

- DNA hibridizado foi detectado por incubação em 100 µl de uma solução de 0,075 µg/ml de Poly-HRP Streptavidin a 30°C por 15 minutos, com agitação a 550 rpm. Depois todo o líquido do 'tubo de ordenação' foi removido rapidamente e duas etapas de lavagem, tal como a mencionada acima, foram realizadas. (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA). A reação de desenvolvimento de cor foi realizada em 100 µl de True Blue® Peroxidase Substrate (KPL, Gaithersburg, MD, USA), que consiste em uma solução tamponada, que contém 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e H₂O₂, por incubação a 25°C por 10 minutos. Os precipitados coloridos produzidos desse modo causam mudanças na transmissão óptica em locais concretos da microordenação, que pode ser lida usando uma leitora ATR01 ou ATS, produzida por CLONDIAG Chip Technologies GmbH (Jena, Alemanha). Op- cionalmente, a leitora ATS pode ter um software específico instalado para processamento automático do resultado de análise da amostra, obtido com o 'tubo de ordenação' desenvolvido na presente invenção.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> GENOMICA S.A.U.

<120> KIT DE DIAGNÓSTICO IN VITRO PAR IDENTIFICAÇÃO
DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM AMOSTRAS CLÍNICAS

<130> GBP290470

<160> 141

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 1

tgtatgtgga agatgtagtt acggatgcac

30

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 2

catgacgcac gtactcttta taatcagaat t

31

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 3

tgtatgtagc agatttagac acagatgcac

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 4

catggcgcat gtattcctta taatctgaat

30

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 5

gtagatatgg cagcacataa tgacatat

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 6

ttctgaagta gatatggcag cacataatga

30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 7

anctgtgcaa aataacctta actgcagacg

30

<210> 8

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 8

atacatatcat tctatgaatt ccactatatt g

31

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 9

cccaggaggc acactagaag atacttatag

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 10

atcatattgc ccaggtacag gagactgtgt 30

<210> 11
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 11
 cttattttca gccggtgcag catcctttt. 29

<210> 12
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 12
 gaatagcagt attttagagg attggaactt 30

<210> 13
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 13
 agttaaagtt ttggaatgtg gatttaaagg a 31

<210> 14
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 14
 tggtttaaatt ggagtggatg cagatgctgc 30

<210> 15
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 15
 atctttccttt ggcacaggag gggcgttacg 30

<210> 16
 <211> 30

<212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 16
 aaceatttat aagacatggc gaagaatatg

30

<210> 17
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 17
 acattttaatg aatgcctcca tattggagga

30

<210> 18
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 18
 gtaacgcccc tcctgtgcca aaggaagatc

30

<210> 19
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 19
 cttgtggcag ctgggggtga caatccasta

30

<210> 20
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 20
 gataacgttt gtgtggttgc agatctagtc

30

<210> 21
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 21
 ttccagccct caagtaaagt ggagttcata 30

<210> 22
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 22
 tgtagtatca ctgtttgcaa ttgcagcaca 30

<210> 23
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 23
 agaacctgag ggaggtgtgg tcaatccaaa 30

<210> 24
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 24
 taaagagtat ttaagacatg gtgaggaatt tga 33

<210> 25
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 25
 catatattca cagtatgaat cctgctatatt t 31

<210> 26
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 26
 agttagtata cttgtatgtg tcttcagttg tt 32

<210> 27
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 27
 ttcccaaaat gaatagtcag aaaaaggatc

30

<210> 28
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 28
 tactgtcact agttacttgt gtgcataaag

30

<210> 29
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 29
 gtatatattac ctaaggggc ttccttttcc

30

<210> 30
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 30
 aaaggaagac cccttaggta aatatacatt

30

<210> 31
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 31
 caactatgca aagttacatt aactgcagaa

30

<210> 32
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

 <400> 32
 atatgggtgga gttgtacttg tggattgtgt 30

 <210> 33
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 33
 tccttaggag gttgaggacg ctgacatgta 30

 <210> 34
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 34
 gtcactagaa gacacagcag aacacacaga 30

 <210> 35
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 35
 aatggatcat ctttaggttt tggcgactg 30

 <210> 36
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 36
 gtaccttaga ggacacatat cgctatgtaa 30

 <210> 37
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 37
 atgtaacatc acaggctgta acttgtcaaa 30

<210> 38
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 38
 ggtatgggaag actctataga ggtagataat g

31

<210> 39
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 39
 gtatctgtaa gtgtctecca aactggcaga

30

<210> 40
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 40
 gtagtaccaa ctttacatta tctacctta

30

<210> 41
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 41
 ataycaggca cgtggaggag tatgatttac

30

<210> 42
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 42
 aactgtgtac tgtcacatta acaactgatg

30

<210> 43
 <211> 30
 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 43

aactgtgtac tgtmacatta acaactgatg

30

<210> 44

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 44

cttgaaatta ctgttattat atggggttgg

30

<210> 45

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 45

cctccaacaa cgtaggatcc attgcatgaa

30

<210> 46

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 46

gtatatgtat caccegatgt tgcagtggca

30

<210> 47

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 47

tagcctgaca gcgaatagct tctgattgta

30

<210> 48

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 48
gtatgtacaa tcagaagcta ttcgctgtca

30

<210> 49
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 49
tacacaatat gactcctaac atattagagg a

31

<210> 50
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 50
gttgaccac caccttcagg aactttagaa

30

<210> 51
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 51
atatgtactg ggcacagtag ggtcagtaga

30

<210> 52
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 52
aagcagaggc aggtggggac acacaaaat

30

<210> 53
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 53
tatatgtaga cggaggggac tgtgtagtgg

30

<210> 54

<211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 54
 cgcacgtatt gcttatattg ttcactagta t

31

<210> 55
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 55
 ctgcttttct ggaggtgtag taccctttt

29

<210> 56
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 56
 ggcacaggat ttgtgtaga ggcacataat

30

<210> 57
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 57
 atgaycctac taagtittaag caststaga

30

<210> 58
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 58
 tmcctccacc acctactaca agtttrgtgg

30

<210> 59
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 59

tcgtttttgtg caatcagttg ctgttacctg

30

<210> 60

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 60

taaatgttgg ggaacaccga gcagtggcag

30

<210> 61

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 61

tggaggggtg tccttttgac agctagttagc

30

<210> 62

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 62

ggcttattta cacacaatgg atcctaccat

30

<210> 63

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 63

acaatggatc ctaccattct tgaacagtgg

30

<210> 64

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 64

gattaacatt acctccgtct gctagtttgg

30

<210> 65
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 65
 ttatatgtgc ttcccttttt aacctcagca

30

<210> 66
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 66
 gtgtcctcca agatgcaga cgggtggtgg

29

<210> 67
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 67
 aacctcagca gacagggata ttttacatag

30

<210> 68
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 68
 aagctagtgg caacaggagg cgaccaacct

30

<210> 69
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 69
 gctatcctgc gtggatgctg tagcacacaa

30

<210> 70
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
<223>

<400> 70
aactacttgt agctggggg gttataccaa 30

<210> 71
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223>

<400> 71
atctgctgta agggttatgg tacataactg 30

<210> 72
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223>

<400> 72
tgtctaaggt actgattaat ttttcgtgca 30

<210> 73
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223>

<400> 73
tttctcttct aggcgtggtg ccaactggcg 30

<210> 74
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223>

<400> 74
tataattagt ttctgtgktt acagtggcac 30

<210> 75
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223>

<400> 75

agtcctctag caaccgcga tccatgttat 30

<210> 76
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 76
 atattcttca acatgacgta cataatcctt 30

<210> 77
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 77
 tcttcttttag ttacttcagt gcataatgtc 30

<210> 78
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 78
 ccttccttag ttacttcagt gcataatgtc 30

<210> 79
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 79
 ctggcatatt ctttazaact ggtaggtgtg 30

<210> 80
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 80
 tcctgtttaa ctggcgggtg ggtgtcctt 30

<210> 81
 <211> 30

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 81
tctttctgtg tgtgcttcta ctactbcttc

30

<210> 82
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 82
tttaaagaat atgccagaca tgtggaggaa

30

<210> 83
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 83
aatgtcatac attcataata tgaataccac

30

<210> 84
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 84
tatattcaga tacagggggg gatgtagcag

30

<210> 85
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 85
ataacttggc atagcgatcc tccttgggag

30

<210> 86
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 86
atatttccta aagcttgtgg ctttatattc 30

<210> 87
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 87
gtggaagggg gaggtaaaac cccaaagttc 30

<210> 88
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 88
atacgggtcc accttgggac gggtaggcag 30

<210> 89
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 89
aaatgtcatt tgcgcatacg ggtccacctt 30

<210> 90
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 90
gttaatgtgc ttttagctgc attaatagtc 30

<210> 91
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 91
tggcgaaggt attgattgat ttcacgkgca 30

<210> 92
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 92
 cacatggcga aggtattgat tgatttcacg

30

<210> 93
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 93
 taatacttta ttagacgatt ggaayattgg

30

<210> 94
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 94
 aggataaata taggtatatt azaagcacag

30

<210> 95
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 95
 tcttcctttg ctgttgagg ggatgtttt

30

<210> 96
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 96
 tgggtgtgat gtattgcata acatttgacg

30

<210> 97
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

 <400> 97
 gttttcattt ttgtatgtag cctctgattt 30

 <210> 98
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 98
 aggtgcaggg gcgtctttt gacatgtaat 30

 <210> 99
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 99
 agcggatgt atctacaaga ctagcagatg 30

 <210> 100
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 100
 gttgtgtact ataacattgt caactgatgt a 31

 <210> 101
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 101
 gttgtgtact ataacattat caactgatgt a 31

 <210> 102
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 102
 gtgttgccc tccaccatct gctagtcttg 30

<210> 103
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 103
 atgggttttaa agtggcagat gcagattgtg 30

 <210> 104
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 104
 tgtgcagggg catcgcttg acatgtagta 30

 <210> 105
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 105
 aaactttgta gggctatata cagcaggat 30

 <210> 106
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 106
 tggtagggg gtaactccta tattccaatt 30

 <210> 107
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 107
 aatattccat gaactagag gctttatatg 30

 <210> 108
 <211> 30
 <212> DNA

<213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 108
 tttttctgca ggaggaggac tgtttttctg 30

<210> 109
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 109
 tctgatcacg aggacgctgt ggcagtacaa 30

<210> 110
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 110
 gtggcgaaga tcttcacgaa aattagaagc 30

<210> 111
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 111
 tagagttggc atacgttgta gtagagctac 30

<210> 112
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 112
 gagttggcat acgttgtagt agagctacta 30

<210> 113
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda

<400> 113
 aggaggttga ggacgttggc aactaatagc 30

<210> 114
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 114
 ctatgaattc tactatattg gaagagtgga 30

<210> 115
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 115
 accccaccac cgtcaggtac tttagaggaa 30

<210> 116
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 116
 tttaaattgc atagggattg ggctttgctt 30

<210> 117
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 117
 tttaaattggc atagggatta ggctttgctt 30

<210> 118
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 118
 agcagaaggc gattgtgagg taggagcaca 30

<210> 119

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 119
 agcaggaggg gattgtgtag taggcgcaca

30

<210> 120
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 120
 ttctgcagca gcagatgtag ctgtgcaaat

30

<210> 121
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 121
 ctgtccaaaa tgacatgtcg gcatsaggg

30

<210> 122
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 122
 tgcaacagat ggagtaacag cagtgcataat

30

<210> 123
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 123
 tgcaactgat ggagtagcag cagtgcataat

30

<210> 124
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Sonda
 <400> 124
 tgtagaatcc atggtgtgca ggtaagccat 30

<210> 125
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 125
 ttcattagcc tgtgtagcag cagctgaaat 30

<210> 126
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 126
 cactcatcya ataatgttc attcatacta t 31

<210> 127
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 127
 atattctgat tcggtgttgg tagcagcact 30

<210> 128
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 128
 aaataggaca tgacctctgg agtcagacgg 30

<210> 129
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 129
 atatagatgg aactggatta gtagttgcag 30

<210> 130
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 130
 cctttttttg tggaacaacc acatccttct

30

<210> 131
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 131
 tccttaaagc gtgtagaact-gtattctgtg

30

<210> 132
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 132
 atctcaggcg ttagggtgtat cttacatagt

30

<210> 133
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 133
 aatggcccga gaggtaagaa agcgataggt

30

<210> 134
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 134
 actaggatca tcgggaaaag

20

<210> 135
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

 <400> 135
 tggctctcta ttcaatcagc 20

<210> 136
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

 <400> 136
 ttctccaccc actacgcacc cccgccagca 30

<210> 137
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

 <400> 137
 gggctcaagc tctaatgcc aaagacctac tactctg 37

<210> 138
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

 <400> 138
 ctcataggc accccaggct ttacacttta t 31

<210> 139
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Sonda

 <400> 139
 tcactcatta ggcacccag gctttacact ttatg 35

<210> 140
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

 <400> 140

gcagiatag attattgatg ccggaac

27

<210> 141
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 141
 gtcaaaacct gggatagtag tttacc

27

<210> 142
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 142
 cgtccmarrg gawactgatc

20

<210> 143
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 143
 gcmcagggwc ataayaatgg

20

<210> 144
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 144
 gcgacccaat gcaaattggt

20

<210> 145
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda

<400> 145
 caagctccta atgccaaaga cctactactc

30

<210> 146
 <211> 35

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 146
gggctcaagc tcctaagcc aaagacctac tactc

35

<210> 147
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 147
gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgac

35

<210> 148
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 148
gtagatatgg cagcacatat tgacatattt

30

<210> 149
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 149
gtagatatgg cagctcataa tgcatattt

REIVINDICAÇÕES

1. Ensaio para detectar e tipificar papilomavírus humano (HPV) em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende:
 - realizar uma reação de amplificação de ácido nucléico em uma amostra, sendo que a reação de amplificação destina-se a amplificar uma seqüência-alvo de HPV em um modo não específico para tipo;
 - obter oligonucleotídeos de filamento simples de quaisquer produtos de amplificação;
 - deixar que os oligonucleotídeos de filamento simples se hibridizem, quando possível, com uma pluralidade de sondas específicas para tipos de HPV, dispostas sobre um suporte sólido, sendo que o suporte está localizado dentro de um recipiente de reação apropriado para conter a amostra; e
 - detectar oligonucleotídeos hibridizados.
2. Ensaio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa de amplificação de ácido nucléico é realizada na amostra dentro do recipiente de reação, em contato com as sondas específicas para tipos de HPV sobre o suporte sólido.
3. Ensaio de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que as sondas possuem 20 a 40 nt de comprimento.
4. Ensaio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que as sondas são específicas para a região de L1 do HPV.
5. Ensaio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que uma ou mais sondas são selecionadas do grupo compreendendo SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 133.
6. Recipiente de reação para realizar um ensaio para detectar e tipificar HPV em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende um suporte sólido com uma pluralidade de sondas específicas para tipos de HPV imobilizadas sobre o mesmo, e que é apropriado para conter uma amostra em contato com o suporte sólido.
7. Recipiente de acordo com a reivindicação 6, caracterizado

pelo fato de que as sondas são selecionadas para ligar especificamente seqüências-alvo de HPV, sob as mesmas condições de hibridização para todas as sondas.

5 8. Recipiente de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que uma ou mais das sondas são selecionadas do grupo compreendendo SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 133.

10 9. Kit para a detecção e tipificação de HPV, caracterizado pelo fato de que compreende o recipiente de reação, como definido em qualquer uma das reivindicações 6 a 8, em combinação com um ou mais dos seguintes:

- i) reagentes para extração e/ou purificação de DNA;
- ii) uma mistura de amplificação de ácido nucléico;
- iii) reagentes para uso em visualizar a hibridização de ácidos nucléicos nas sondas do recipiente de reação.

15 10. Kit de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a mistura de amplificação é fornecida em um recipiente de reação separado do recipiente de reação que compreende o suporte sólido com as sondas específicas para tipos de HPV.

20 11. Sonda para detectar e tipificar HPV, caracterizada pelo fato de que é escolhida de SEQ ID NO 1 a 133.

LR											LR
	122	122	123	123							
LR	14	14	44	44	47	47	52	52	60	60	LR
LR	98	98	105	105	136	136	145	145	138	138	LR
	38	38	54	54	56	56	65	65	80	80	LR
	6	6	10	10	22	22	29	29	34	34	LR
	51	51	61	61	124	124	1	1	3	3	LR
	148	148	149	149	15	15	45	45	46	46	LR
	66	66	79	79	76	76	99	99	106	106	
	28	28	35	35	39	39	53	53	55	55	
LR	2	2	4	4	5	5	11	11	23	23	LR

Fig.1

LR	116 117	116 117	118 119	118 119	129	129	130	130	77 78	77 78	LR
	21	21	26	26	27	27	103	103	104	104	
LR	147	147	146	146	137	137	19	19	20	20	LR
LR	97	97	107	107	108	108	61	61	139	139	LR
	87	87	88	88	89	89	95	95	96	96	LR
	113	113	32	32	33	33	74	74	75	75	LR
	125	126	126	127	127	128	128	111	111	112	LR
	120	120	121	121	131	131	132	132	133	133	LR
112	90	90	91	91	92	92	109	109	110	110	
125	72	72	73	73	84	84	85	85	86	86	
LR	67	67	68	68	69	69	70	70	71	71	LR

Fig.2

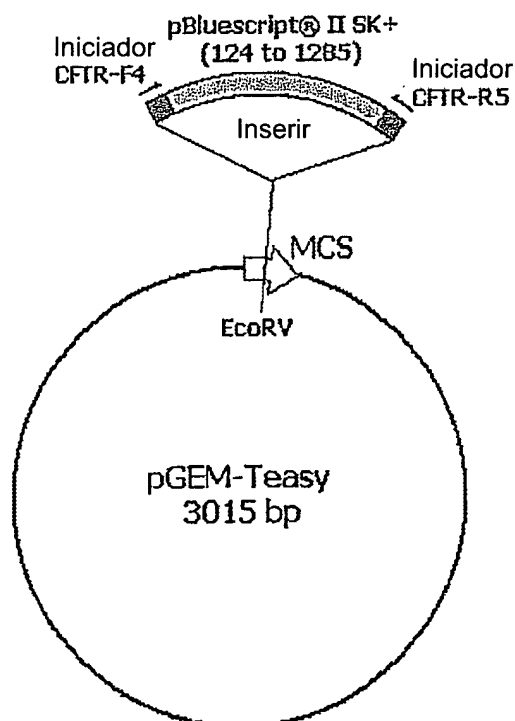
LR	M3	M3	129 130	129 130	136 145	136 145	136 146	136 146	136 137	136 137	LR
	19 20	19 20	19 21	19 21	20 21	20 21	26 27	26 27	103 104	103 104	
LR	87 88	87 88	87 89	87 89	95 96	95 96	95 97	95 97	107 108	107 108	LR
LR	127 128	127 128	111 113	111 113	112 113	112 113	32 33	32 33	74 75	74 75	LR
	120 121	120 121	131 132	131 132	131 133	131 133	132 133	132 133	125 126	125 126	LR
	84 85	84 85	84 86	84 86	90 91	90 91	90 92	90 92	109 110	109 110	LR
	M2	67 68	67 68	69 70	69 70	69 71	69 71	70 71	72 73	72 73	LR
72 73	44 45	44 45	46 47	46 47	51 52	51 52	60 61	60 61	122 123	122 123	LR
M2	65 66	79 80	79 80	M1	M1	98 99	98 99	105 106	105 106	14 15	14 15
65 66	28 29	28 29	34 35	34 35	38 39	38 39	53 54	53 54	55 56	55 56	
LR	1 2	1 2	3 4	3 4	5 6	5 6	10 11	10 11	22 23	22 23	LR

Fig.3

LR	105 106	107 108	109 110	111 113	120 121	M2	125 126	127 128	129 130	131 132	LR
60 61	65 66	67 68	69 71	72 73	M1	79 80	84 85	87 88	90	98 99	
LR	10 11	14 15	22 23	28 29	34 35	38 39	44 45	46 47	51 52	53 54	55 56
	120 121	M2	125 126	127 128	129 130	131 132	138 139	136 137	1 2	3 4	5 6
69 71	72 73	M1	79 80	84 85	87 88	90	98 99	105 106	107 108	109 110	111 113
22 23	28 29	34 35	38 39	44 45	46 47	51 52	53 54	55 56	60 61	65 66	67 68
M2	125 126	127 128	129 130	131 132	138 139	136 137	1 2	3 4	5 6	10 11	14 15
72 73	M1	79 80	84 85	87 88	90	98 99	105 106	107 108	109 110	111 113	120 121
	38 39	44 45	46 47	51 52	53 54	55 56	60 61	65 66	67 68	69 71	
LR	138 139	136 137	1 2	3 4	5 6	10 11	14 15	22 23	28 29	34 35	LR

Fig.4

LR	63 64	63 64	93 94	93 94	114 115	114 115	100 101	100 101	M4	M4	LR
	17 18	17 18	24 25	24 25	30 31	30 31	36 37	36 37	62 64	62 64	
LR	7 8	7 9	7 9	8 9	8 9	12 13	12 13	16 17	16 17	16 18	16 18
	100	100	101	101	102	102	114	114	115	115	7 8
64	64	81	81	82	82	83	83	93	93	94	94
50	50	57	57	58	58	59	59	62	62	63	63
40	40	41	41	42	42	43	43	48	48	49	49
24	24	25	25	30	30	31	31	36	36	37	37
	12	12	13	13	16	16	17	17	18	18	
LR	138 139	138 139	136 137	136 137	7	7	8	8	9	9	LR

Fig.5**Fig.6**

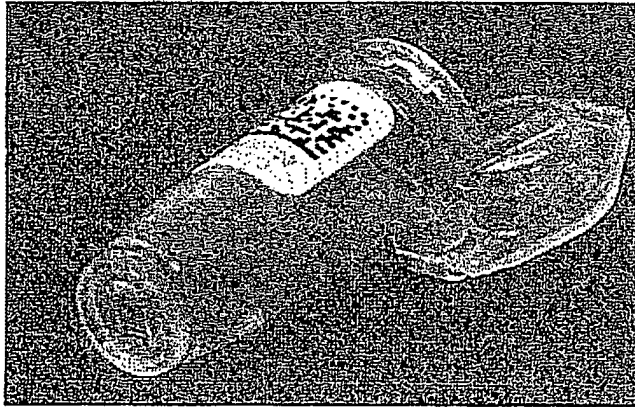


Fig.7

RESUMO

Patente de Invenção: "ENSAIO, RECIPIENTE DE REAÇÃO PARA REALIZAR O MESMO, KIT E SONDA PARA DETECTAR E TIPIFICAR PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM UMA AMOSTRA".

5 A presente invenção refere-se a um método e um kit para detecção e tipificação de HPV em uma amostra, tal como um recipiente de reação para uso no método. Iniciadores de HPV universais são usados para amplificar uma amostra por PCR; a amostra amplificada é depois hibridizada a uma série de sondas específicas para tipos de HPV para determinar o tipo de
10 HPV.