



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 944**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05777709 .6**

96 Fecha de presentación : **14.07.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1711636**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2006**

54 Título: **Procedimiento de detección y cuantificación *in vitro* de ADN de VIH mediante PCR cuantitativa.**

30 Prioridad: **06.08.2004 ES 200401986**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.11.2009

73 Titular/es: **Geno-Madrid S.A.**
Barceló, 15 - 5 Izda.
28004 Madrid, ES

72 Inventor/es: **Muñoz Fernández, María Ángeles y**
Fernández Gómez-Chacón, Gerónimo

74 Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección y cuantificación *in vitro* de ADN de VIH mediante PCR cuantitativa.

5 **Ámbito de la invención**

La invención se adscribe al ámbito de los procedimientos y dispositivos de diagnóstico basados en PCR. En concreto se trata de detectar y cuantificar el ADN de VIH en pacientes.

10 **Estado de la técnica**

Los principales parámetros utilizados en el seguimiento de la infección por el VIH son la “carga viral” en plasma (cuantificación de ARN de VIH) y el porcentaje o número de linfocitos CD4[1]. Es de gran importancia conocer el número de copias de ADN de VIH presentes en las células, especialmente en pacientes en Terapia Anti-retroviral de Gran Actividad (TARGA) donde la carga viral ha disminuido, incluso a nivel indetectable y se ha observado un incremento o estabilización del porcentaje o número de linfocitos CD4, así como en individuos en interrupción de tratamiento. [3]

Utilidades de la cuantificación del ADN viral:

- Diagnóstico de la infección por el VIH en niños procedentes de madres seropositivas y en individuos adultos en periodo ventana (en interrupción del tratamiento). La ventaja es que al ser cuantitativo se sabrá el número de copias de ADN de VIH presentes en las células en el momento más cercano a la infección pudiendo convertirse en un marcador pronóstico de evolución de la infección.

- En pacientes tratados con terapia antirretroviral de alta eficacia (TARGA), donde la carga viral es indetectable (< 400 copias/ml; ultrasensible < 50 copias/ml), actualmente sólo existe como marcador de sistema inmune los linfocitos CD4, sería de gran importancia tener un marcador virológico y en este sentido se podría utilizar el número de copias de ADN de VIH presentes en las células como marcador pronóstico de evolución, que prediga cuándo va a surgir un rebote de carga viral y evitar la aparición de cepas resistentes.

- En pacientes en interrupciones de tratamiento. Antes de las interrupciones del tratamiento antirretroviral uno de los requisitos que debe reunir el paciente es tener carga viral indetectable, sería de gran valor saber el número de copias de ADN de VIH presentes en las células antes de la interrupción y saber qué tiempo pueden estar sin tratamiento para que no haya un rebote de carga viral y surjan resistencias a los antirretrovirales.

- En pacientes en los que se va a aplicar un tratamiento inmunológico o vacuna terapéutica, donde sería de gran importancia conocer el número de copias de ADN de VIH presentes en las células para ver hasta qué punto el número de células infectadas es importante para conseguir un sistema inmunológico funcional a largo plazo y que pueda controlar la replicación del VIH por sí mismo.

- Detectar subpoblaciones celulares infectadas que puedan actuar como reservorio del VIH y que potencialmente no pueden ser infectadas por él.

- Aplicación a la investigación básica en distintos estudios *in vitro* e *in vivo*.

- Como un parámetro para detección y seguimiento del VIH inactivo.

- En general será una técnica muy útil para su aplicación en la clínica diaria habitual y en los ensayos clínicos de pacientes VIH+.

La aplicación de nuevas terapias antiretrovirales a la infección por VIH ha promovido drásticos cambios en la evolución natural de esta infección, por esta razón es muy interesante conocer la relación entre reconstitución del Sistema Inmune y permanencia del VIH en el paciente, incluso se podría llegar a conocer en qué momento el sistema inmune podría controlar la infección y poder suprimir un tratamiento antirretroviral. Las actuales técnicas de cuantificación de carga viral y genotipado o fenotipado no son suficientes para poder predecir la evolución de la infección cuando la carga viral es indetectable independientemente del porcentaje o número de linfocitos T CD4.

La cuantificación del ADN viral que propone la presente invención constituye una técnica novedosa que podría ser útil como marcador diagnóstico, pronóstico de evolución de la infección y de seguimiento de la misma. Además permitiría detectar las subpoblaciones celulares que actúan de reservorio para el VIH.

Presentamos un método innovador para cuantificar el ADN de VIH, (Carga de ADN viral) en células infectadas, de un modo sencillo, reproducible y rápido por PCR cuantitativa a tiempo real. El método presentado detecta y cuantifica todas las formas de ADN de VIH presentes en la célula, tanto integrado como no integrado, aunque haya muy poco número de copias, aplicando en este caso una forma de realización de la invención que convierte al método en

ultrasensible. En este momento no hay un método capaz de detectar ADN VIH proviral (integrado en el genoma) de modo específico, reproducible, fácil y rápido.

El objetivo último de cualquier organismo vivo es su perpetuación en el tiempo. La única forma que tiene de conseguirlo el VIH, al igual que otros retrovirus, es insertar su genoma en el ADN celular.

En las primeras fases del ciclo de infección, al finalizar el proceso de descapsidación, se inicia la reacción de retrotranscripción dando lugar al Complejo de Pre-Integración (PIC), con el genoma viral ahora en forma de ADN, que se dirige hacia el núcleo. Allí, dicho PIC, puede ser objeto de diferentes procesos: recircularización del ADN viral con uno o dos extremos LTR (Long Terminal Repeat), secuencias grandes repetidas en los extremos), o integración en el cromosoma celular [2]. Sólo en este último caso se establece el provirus funcional, la única forma infectiva. De este modo el VIH no será detectado por el sistema inmune y podrá permanecer en la célula, se replicará con el resto del ADN celular generando nuevas células portadoras del VIH. En condiciones óptimas este ADN del VIH será transcrito y traducido por la maquinaria celular generando nuevas partículas VIH que infectarán nuevas células [2].

Actualmente es posible cuantificar el número de partículas virales circulantes en plasma por la técnica de “Carga Viral” (detección del ARN de VIH) que, junto con el marcador inmunológico de cuantificación de linfocitos CD4, son los dos parámetros utilizados habitualmente en el seguimiento de la infección por el VIH en pacientes por parte del personal médico, para introducir un tratamiento antirretroviral, o cambiar el mismo.

El número de partículas virales que pueden infectar una misma célula es variable, así como el número de veces que se retrotranscribe un mismo RNA, de modo que la cantidad de ADN viral contenido en una célula es variable, pudiendo haber un gran cantidad de copias o muy bajo número de las mismas.

El ADN proviral representa una amenaza oculta para la vida de la célula, y por tanto para la vida de la persona infectada, porque se puede activar y aumentar la carga viral sin que ningún parámetro de los utilizados lo haya previsto, produciendo un fallo de la terapia antirretroviral y surgiendo cepas resistentes. Por esta razón, en pacientes que inician por primera vez un tratamiento antirretroviral, o están en TARGA, en otro tratamiento terapéutico, o inician una interrupción del mismo puede ser importante conocer el comportamiento y variaciones del ADN proviral, “Carga Proviral”.

En los últimos años se han desarrollado varios ensayos para la detección y cuantificación de ADN proviral utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero estos métodos no han sido capaces de detectarlo en todos los casos [4] [5] [6] ya que sólo operan con indicios de la posición en la que se integra el ADN viral en el genoma celular. En la actualidad es bien conocida la secuencia del genoma del VIH y por tanto se han podido diseñar parejas de cebadores u oligonucleótidos que anillan en algún gen del VIH y así poder detectar su presencia por PCR y cuantificar el ADN total.

En el estado de la técnica se describen métodos para la detección del ADN de VIH, por PCR, diseñando cebadores que anillan en el gen viral *pol* y en el gen *gag* ya que son los genes que tienen una secuencia menos variable. En concreto, el gen *gag* tiene 1300 pb, de donde se pueden obtener cientos o miles de parejas de cebadores diferentes, cada una con características también distintas, sobre todo en base a su “temperatura de fusión” (Tm). Unas técnicas utilizan una PCR sencilla con cebadores de *pol* o *gag*, o bien una “PCR anidada”, es decir, dos PCRs consecutivas con igual o distinta pareja de cebadores para cada una, utilizando como ADN molde para la segunda el producto amplificado en la primera. La detección del producto en estos dos tipos de PCR se hace por visualización del producto amplificado en gel de agarosa. La información obtenida es sólo, por consiguiente, cualitativa, no cuantitativa, a diferencia del método de nuestra invención.

Otros métodos proponen cuantificar el producto de PCR por un ELISA o una hibridación sobre el producto amplificado después de realizada la electroforesis en gel de agarosa.

Además, el documento Yourno *et al.*, J Clinical Microbiol. 30, 2887-2892 (1992) describe un método para la detección del VIH en muestras de sangre. El método está basado en PCR anidada utilizando cebadores *gag* y una sonda interna.

El método de la invención utiliza la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real de Roche “LightCycler-qPCR” (LC-qPCR), aunque podría utilizarse con cualquier sistema de PCR cuantitativa (Applied Bio-System), mediante la correspondiente adaptación del programa de amplificación, curvas patrón y otros parámetros conocidos por cualquier técnico que opere este tipo de métodos de PCR cuantitativa. Para el método de la invención se han diseñado cebadores para el gen *gag*, y una pareja de sondas tipo F.R.E.T. (Fluorescence Resonance Transfer) para la detección del producto de ADN amplificado. Esto permite una mayor precisión en la detección del producto específico, no detectando posibles productos secundarios no deseados, ya que es necesario que unan dichas sondas en sus posiciones exactas del producto para que éste sea cuantificado, a diferencia de la sonda Taqman®, que al actuar en solicitarlo, puede cuantificar productos no específicos al unir en productos con secuencia parecida a su diana. En la actualidad no hay descrito ningún método de cuantificación de ADN pro viral de VIH utilizando el sistema LightCycler-qPCR de PCR cuantitativa.

Un objeto de la presente invención es desarrollar parejas de oligonucleótidos que se unan específicamente al gen *gag* del virus VIH y permitan la amplificación del ADN viral por PCR.

Un segundo objeto de la invención es desarrollar una pareja de sondas que permite detectar de forma eficaz por fluorescencia, el producto de ADN viral de VIH amplificado por PCR, eliminando el fondo inespecífico.

Un tercer objeto de la invención es un método de detección *in vitro* de ADN viral de VIH y que permite la detección de ADN proviral de VIH.

Otro objeto de la invención son los dispositivos de ensayo, que comprendan los oligonucleótidos de la invención, utilizando opcionalmente también las sondas de la invención.

Una realización preferida de la invención consiste en aplicar el método de detección también a muestras con carga viral baja (<100 copias).

Otra realización preferida de la invención consiste en modificar el método de detección y cuantificación de ADN de VIH desarrollando una segunda pareja de cebadores que permita acortar los tiempos de ensayo aumentando al mismo tiempo la señal de fluorescencia específica del ADN viral presente en la muestra ensayada.

Un objeto adicional de la invención consiste en el uso de los oligonucleótidos y las sondas en dispositivos y/o métodos de detección de ADN viral de VIH.

20 Descripción de la invención

La invención consiste en un método innovador para la cuantificación de ADN de VIH en células. Este método se caracteriza por su sensibilidad, reproducibilidad y especificidad para la detección/cuantificación del ADN del VIH en muestras con número de copias iniciales medio/alto y también una forma preferida de realización de la invención consiste en un método ultrasensible para la detección de muestras con copias iniciales bajas.

Un punto importante y a destacar en este método es la extracción del ADN, que debe obtenerse puro y limpio, y su cuantificación por espectrofotometría UV para poder conocer la cantidad de molde que se pone en la reacción de PCR, y así poder normalizar los resultados por μg de ADN o por 10^6 células.

A priori no se puede estimar si la cantidad de ADN de VIH presente en cada muestra es detectable por el método convencional de la invención o si es necesario recurrir al método ultrasensible. Por este motivo, se realiza primero la LC-qPCR-Gag, y si no se obtiene amplificación se aplica el método ultrasensible para muestras con bajo número de copias de ADN VIH iniciales. Sólo en el caso que el número de linfocitos CD4 sea inferior a 400 células/ml, se aplica directamente el método ultrasensible para muestras con bajo número de copias de ADN del VIH iniciales.

Sólo las células T presentes en las células mononucleares de sangre periférica del paciente son potenciales portadoras del ADN viral y de acuerdo con la información obtenida por este método el número de copias de ADN viral por linfocito T varía en función del número de linfocitos CD4, por este motivo, la cuantificación del ADN de VIH debe ser analizada en comparación con el número de linfocitos CD4 y la carga viral para así poder evaluar mejor la evolución de la infección.

Para aplicar el método de la invención se utiliza el aparato de PCR cuantitativa denominado LightCycler (Roche) formado por un termociclador que enfría y calienta las muestras por aire. Este aparato tiene acoplado un fluorímetro que detecta la fluorescencia emitida, por ejemplo atribuible a las sondas tipo FRET que se unen al producto formado en cada ciclo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para que este aparato dé un número de copias o cuentas en las muestras debe extrapolar la fluorescencia obtenida en éstas a una recta o curva patrón que se obtiene poniendo un número de copias de ADN conocido en cada punto de dicha recta. El aparato, acoplado a un ordenador, asocia la fluorescencia obtenida en cada punto de la curva con el número de copias de ADN respectivo y lo representa en una gráfica de fluorescencia frente a número de copias, gráfica que se ajusta a una recta que nos permite calcular, en base a la fluorescencia medida en la muestra problema, el número de copias de ADN viral presente en la misma.

Para detectar el ADN de VIH por PCR se necesita una pareja de cebadores, oligonucleótidos o iniciadores que se unan en algún gen viral y utilizar un programa adecuado [8]. El VIH es un retrovirus con alta capacidad de mutación, principalmente en el gen *env* y en presencia de tratamiento antirretroviral, también en el gen *pol*. Por este motivo los iniciadores deben unirse en genes más conservados, con menos variabilidad, como el gen *gag*, y así poder detectar todas las variantes posibles del VIH, en todas las formas presentes en la célula, integrado y no integrado.

Para este método innovador se han diseñado dos cebadores, F-Gag y R-Gag (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2), que amplifican un fragmento de 222 pb del gen *gag* (en las posiciones 1260 a 1482) ya que, como se ha mencionado anteriormente, es un gen con secuencia muy conservada. A lo largo de la presente memoria descriptiva los términos cebador, iniciador u oligonucleótido se emplean indistintamente.

Para determinar las mejores condiciones del programa que se debía aplicar para la realización de la PCR se repitieron varios experimentos, modificando la temperatura de unión de los cebadores, concentración de los mismos, la concentración de MgCl_2 y el número de ciclos. Las condiciones seleccionadas fueron: un programa que tiene una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C , seguida de 35 ciclos de amplificación con 1 minuto a 95°C , 30 segundos a 65°C y 1 minuto a 72°C , con una elongación final de 4 minutos a 72°C . Cada $25\ \mu\text{l}$ de mezcla de reacción contiene

de 0.5 a 1 μ l g de ADN genómico, 0.8 μ l M de cada cebador, 0.10 mM dCTP, 0.10 mM dGTP, 0.10 mM dATP, 0.10 mM dTTP, 1 U de enzima ADN polimerasa Amplitaq Roche, 50 mM KCL, 3.5 mM MgCl₂ y 10 mM de Tris-HCl (pH 8.3). El producto amplificado se comprobó en un gel de agarosa al 2% (Fig. 1).

- 5 Una forma preferida de realización de la invención consiste en modificar el método haciendo una PCR anidada utilizando además de la primera pareja de cebadores (SEQ ID NO: 1 y 2) en una primera amplificación, una segunda pareja de cebadores F2-Gag y R2-Gag (SEQ ID NO: 7 y 8), que amplifica, a su vez, en una segunda etapa, el producto amplificado resultante de la primera etapa de amplificación (Producto Gag1). Esta segunda pareja de cebadores se une en el interior del fragmento amplificado por la primera pareja (entre las posiciones 1286 y 1435), dando un producto
10 Gag2 de 149 pb, sobre el que se unen las sondas P1-Gag y P2-Gag (entre las posiciones 1320 y 1381).

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1

- 15 *PCR-Gag cuantitativa con sistema LightCycler*

El ADN genómico fue extraído de 10⁶ células con el kit “Wizard SV Genomic DNA purification system” de PRO-MEGA (cat. #A2360), y resuspendido en 100 μ l de agua libre de nucleasas PROMEGA (cat. #P119C). Finalmente, se
20 cuantificó este ADN con el espectrofotómetro “Nano-Drop 3.0.0/3”.

El aparato para la realización de la PCR cuantitativa es un LightCycler, un termociclador por aire que incorpora un fluorímetro para la detección y cuantificación de los productos amplificados sin necesitar un análisis post-PCR en gel de agarosa de los productos obtenidos como sucede en la realización de una PCR convencional. La amplificación
25 se realiza en capilares de vidrio utilizando una enzima ADN polimerasa modificada con gran eficiencia, alta velocidad de elongación y capacidad para soportar rápidos cambios de temperatura (20°C/seg). La ventaja de la utilización de capilares de vidrio es que permite un rápido calentamiento y enfriamiento de la mezcla de reacción, y por lo tanto, se realizan ciclos y programas muy cortos [7] [9]. Los productos amplificados se detectan por Sybr-Green, compuesto marcador que se une a ADN de doble cadena por intercalación y emite fluorescencia al ser excitado con luz de
30 longitud de onda adecuada. Otro modo de detección/cuantificación es la utilización de sondas ADN (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6) marcadas con fluorocromos (tipo F.R.E.T.), que se unen específicamente al producto amplificado. La cuantificación de los productos se realiza por extrapolación de la fluorescencia obtenida en cada una de las muestras respecto a una curva patrón realizada con número de copias conocido.

- 35 *Ejemplo 2*

Detección del producto amplificado por Sybr-Green (Cambrex)

Esta forma de realización de la invención se utiliza para muestras cuya carga de ADN viral se presupone alta. Al inicio del desarrollo del método de cuantificación de ADN del VIH se adaptó la PCR-Gag convencional a las condiciones de la PCR cuantitativa LightCycler (LC-qPCR). El programa para el nuevo termociclador comienza con 10 minutos de desnaturalización a 95°C, seguidos de 40 ciclos con 15 segundos de desnaturalización a 95°C, 10 segundos para el anillamiento de cebadores y puntual recolección de fluorescencia (“single data collection”), y 20
45 segundos de elongación a 72°C. Cada 20 μ l de mezcla de reacción contiene de 0.5 μ g a 1 μ g de ADN genómico, 0.5 μ M de cada cebador (F-Gag y R-Gag), 0.10 mM de dATP, 0.10 mM de dCTP, 0.10 mM de dTTP, 0.10 mM de dGTP, y 1 U de enzima “LightCycler FastStart DNA polimerasa (Roche), 50 mM KCl, 3.5 mM MgCl₂, y 10 mM Tris-HCl (pH 8.3). La detección de los productos amplificados se realiza con Syber-Green. Este marcador detecta sólo ADN de doble cadena, por lo que no interfiere con los cebadores utilizados, excepto si éstos forman dímeros. La curva patrón se obtiene utilizando dilución seriada en saltos de un orden de magnitud desde 10⁴ a 1 copia por mezcla de reacción, con ADN procedente de células de la línea 8E5, línea celular linfóide que se caracteriza por portar un único provirus VIH por célula. Para producir esta recta o curva patrón se extrae el ADN de 10 alícuotas de 1 millón de células por alícuota, y se mide o cuantifica en espectrofotómetro UV. Se realiza el promedio del peso del ADN genómico obtenido y se determina en una media de 5 pg, el peso del ADN genómico de una célula 8E5, lo que significa que 5 pg de ADN
55 corresponden a una copia de ADN de VIH.

El sistema de detección por Syber-Green del producto amplificado es inespecífico, ya que se une a todo el ADN de doble cadena presente en la mezcla de reacción, como por ejemplo los dímeros de cebadores, dando por tanto mucho fondo y generando unos datos de cuantificación con error. Aunque el programa de ordenador del sistema
60 del LightCycler-qPCR permitiese restar la fluorescencia de fondo obtenida, control negativo del resto de muestras, se cometería un error importante, ya que el fondo debido a los dímeros de cebadores es distinto en cada muestra, dependiendo de la cantidad inicial de molde que tengan, cuanto más molde inicial menos dímeros de cebadores se formarán, por ello no se puede restar la misma cantidad de fluorescencia a cada i muestra. Sin embargo, este error es asumible en caso de muestras con una carga de ADN viral alta.

65

Ejemplo 3

Detección del producto amplificado mediante sondas F.R.E.T.

Para poder evitar estos problemas en la cuantificación del ADN del VIH, cuando la carga de ADN viral no es alta o no se presupone alta, se diseñó una pareja de sondas de ADN marcadas con fluorocromos, tipo F.R.E.T., denominadas P1-Gag y P2-Gag (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6), que hibridan específicamente en una región entre los cebadores F-Gag y R-Gag del producto amplificado en la PCR-Gag. De este modo sólo se detecta y cuantifica el producto específico de la PCR no habiendo señal de fondo y siendo datos reales.

Para mejorar y aumentar la precisión del método de detección con Syber-Green se realizó una curva patrón nueva más exacta que la anterior con ADN de células 8E5. Para realizar esta curva patrón, el producto amplificado con la PCR-Gag convencional, con ADN de células 8E5, fue clonado en las dianas EcoRI (SEQ ID NO: 4) y BamHI (SEQ ID NO: 3) dentro del plásmido Bluescript II(-) (pBSKII-), Stratagene #212216, crecido en bacterias *Escherichia Coli DH5a* y purificado por Maxiprep. El plásmido con el inserto se denominó "pBSKGag" y después de cuantificarlo en espectro-fotómetro UV y determinado el número de moléculas de plásmido por μl , se hizo una dilución seriada del mismo con saltos de un orden de magnitud desde 10^{10} a 1 molécula/ μl . Los cebadores representados como SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, se utilizan para clonar el producto amplificado entre las dianas Bam HI y Eco RI del plásmido pBSK(-) y utilizarlo como ADN molde en la recta patrón. Estos cebadores representados por SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 son los mismos que SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 pero con las bases añadidas en 5' correspondientes a las dianas de las enzimas de restricción reseñadas. Cada 20 μl de mezcla de reacción de LC-qPCR-Gag contiene de 0.5 a 1 μg de ADN genómico como molde, 0.2 μM de cada sonda fluorescente P1-Gag y P2-Gag, 0.5 μM de cada cebador F-Gag y R-Gag, 0.10 mM de dATP, 0.10 mM de dCTP, 0.10 mM de dTTP, 0.10 mM de dGTP, y 1 U de enzima "LightCycler FastStart DNA polimerasa (Roche), 50 mM KCl, 3.5 mM MgCl_2 , y 10 mM Tris-HCl (pH 8,3).

Con el objeto de comprobar la exactitud de la curva patrón y asegurarnos que todos los conformeros del plásmido pBSK-Gag presentes y cuantificados por espectrofotometría UV en dicha curva daban el producto esperado en dicha PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 2), con 500 ng de dicho plásmido para observar los diferentes conformeros del mismo: lineal, circular relajado (con un corte en una de sus hebras) y superenrollado. Los tres conformeros fueron recortados del gel y extraídos por separado con GENE CLEAN® Spin kit - BIO101 (Cat. #1101-200) en 20 μl de agua libre de nucleasas. Se cogieron 5 μl como molde de cada uno para la PCR-Gag y para ver el resultado se cargaron 10 μl de dicha PCR en un gel de agarosa 2%. El producto de Gag se obtuvo de los tres conformeros, lo que claramente indica que todo el plásmido pBSK-Gag cuantificado da producto en la PCR-Gag. En conclusión las copias teóricas de ADN de la curva patrón son muy próximas a las reales.

De los resultados obtenidos en diferentes ensayos con la curva patrón (Fig. 4) deducimos que se pueden tomar al menos 4 puntos, de los 7 totales. La tasa media de variación entre las diferentes curvas patrón, es menor en los puntos de 10^8 a 10^5 (de -0.1 a +0.1) que en los puntos 10^4 y 10^3 , -0.2 a +0.2, y en el punto 100 es -3.5. Los puntos restantes 10 y 1 tienen una tasa de variación media de -59.1 y -319.0 respectivamente, demasiado altas, ya que tienen problemas de amplificación asociados a las muestras con ADN diana en bajo número de copias; por este motivo estos puntos nunca están incluidos en la curva patrón real, así que el límite inferior de detección con esta qPCR (Tabla 1), sería de 100 copias.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 1: Curvas patrón pBSK-Gag de LC-qPCR Gag.

Tubo	Número teórico de copias	Exp1: 18-3-04 Exp2: 20-2-04 Exp3: 20-2-04b Exp4: 23-2-04 Exp5: 23-2-04b Exp6: 2-3-2004						Tasa de Va- riación media
		112500000	131100000	97580000	102400000	104000000	104000000	
1	100000000							-0,1
2	10000000	8339000	12390000	10970000	9607600	13100000		-0,1
3	1000000	1055000	1180000	895000	1393000	965000	1133000	-0,1
4	100000	98600	74160	1040001	96600	92000	87300	0,1
5	10000	10070	4739	7300	5946	10800	9028	0,2
6	1000	10181	874	16561	839	1900	1120	-0,2
7	100	222	542	795	150	568	431	-3,5
8	10	600	602					-59,10
9	1	250	390					-319,00
NEG control	0	0	0	0	0	0	0	
H2O control	0	0	0	0	0	0	0	
Interno C 1	100000							
Interno C 2	1000							
R		10781	1177	1070001				
Error		1	1	1	1	1	1	
Estandar		0,05	0,1	0,07	0,1	0,04	0,08	

Error medio de la curva patrón: 0,07

Exp1-5: Experimentos en fechas diferentes.

C1 y C2 Son controles internos que se incorporan en la recta patrón sin indicárselo al programa

Ejemplo 4

Detección del producto amplificado en muestras con bajo número de copias. PCR anidada o doble PCR utilizando 2 veces consecutivamente la misma pareja de cebadores

La cuantificación en muestras con bajo número de copias en el ADN molde es muy difícil porque pueden no detectarse copias o detectarse más número de copias de las que realmente están presentes en la muestra. La formación de dímeros de cebador y productos de amplificación no específicos son problemas asociados a este tipo de muestras, ya que se generan más fácilmente que el producto de interés. Estos artefactos de amplificación compiten con las secuencias diana por los reactivos de la mezcla de reacción de PCR dando valores anómalos de amplificación y cuantificación.

Para aumentar el número de copias en el molde de la LC-qPCR realizamos una "PCR anidada" o doble PCR, una combinación de la PCR-Gag convencional y la LC-qPCR-Gag, utilizando los mismos cebadores en las dos PCRs, F-Gag y R-Gag. De este modo se puede detectar el ADN diana cuando hay muy poca cantidad en la muestra. La primera PCR-Gag convencional permite generar suficiente producto de la muestra inicial, para a continuación ser utilizado como molde en la LC-qPCR-Gag. De este modo hay suficiente ADN diana de partida no compitiendo los artefactos ni dímeros de cebador por el producto específico de la PCR, permitiendo así su correcta cuantificación.

Para realizar la LC-qPCR se utilizan como molde 10 µl de los 25 µl de la PCR-Gag convencional de las muestras de pacientes y se ponen tres puntos de la curva patrón con bajo número de copias; 100, 10 y 1 copia por mezcla de reacción. La cuantificación obtenida en la LC-qPCR corresponde al número de copias presentes en los 10 µl de PCR convencional utilizados como molde en la LC-qPCR, no son las copias reales existentes en la muestra. Utilizando las cuentas obtenidas en cada uno de los puntos de la curva con 100, 10 y 1 de copia inicial se obtiene la eficiencia (E) de la PCR-Gag convencional, aplicando la ecuación: [8]

$$T_n = T_o(E)^n \quad (1)$$

donde T_n es el número de copias al final de la PCR, T_o es el número de copias iniciales en el molde, E es la eficiencia de la reacción de PCR (suele estar entre 1,8 y 2), y n es el número de ciclos de la PCR. El punto de la curva patrón 100 tiene $T_o(100) = 100$ y su $T_n(100)$ en la PCR-Gag convencional es su $T_o(100)q$ en la LCqPCR-Gag. Introduciendo estos valores en la ecuación (1) se obtiene el valor de E :

$$E = \sqrt[n]{T_n/T_o} \quad (2)$$

$$E = \sqrt[n]{T_o(100)q/100} \quad (3)$$

La E obtenida en (3) de la PCR-Gag convencional se calcula para los tres puntos de la curva patrón, 100-10-1, y se determina la E media (1,8-2), que se puede asumir que es la misma para todas las muestras de la misma reacción, de modo que a partir de ella se puede determinar el número de copias iniciales presentes en las muestras de pacientes, $T_o(\pi)$, (4). La E de una PCR no es exactamente la misma para todas las muestras, ni en todos los ciclos de la reacción, ya que depende del número de ADN diana presente en el molde. En los ciclos iniciales, el molde es pequeño, y la E también, según aumenta la cantidad de molde la E también lo hace, ya que hay más molde y se producen más copias llegando la amplificación a ser exponencial, acercándose, por tanto, la E a 2.

En la LC-qPCR-Gag se obtiene para cada muestra de paciente su $T_o(\pi)q$, que es su $T_n(\pi)$ de la PCR-Gag convencional, que introduciéndolo en (4) se obtiene el $T_o(\pi)$.

$$T_o \pi = T_n \pi / E^{35} \quad (4)$$

El factor exponencial de E depende del número de ciclos de PCR aplicados.

Los algoritmos consignados conforman el programa de ordenador diseñado y comprendido en la presente invención para la correcta aplicación del método de medición del ADN viral descrito (Esquema explicativo en Figura 3).

Ejemplo 5

Resultados de la aplicación del método ultrasensible GagI

La técnica descrita se aplicó a un grupo de pacientes VIH infectados en tratamiento con terapia TARGA con "carga viral" baja o indetectable. Se realizó la LC-qPCR-Gag no obteniéndose cuentas en algunas de ellas, por lo que se aplicó el método para muestras con bajo número de copias iniciales, realizando primero una PCR-Gag convencional, y a continuación 10 µl de ésta se utilizan como molde para la LC-qPCR-Gag.

ES 2 328 944 T3

Los resultados obtenidos en estas muestras fueron inferiores a 435 copias/ μg ADN (1306 copias/ 10^6 células), habiendo muestras con menos de 1 copia/ μg ADN, es decir, 1 copia por 333333 células (ya que el genoma de una célula humana equivale aproximadamente a 3 pg). Sólo en los casos en los que no se obtuvo amplificación se puede decir que tienen "ADN VIH no detectable".

Las muestras con valores medios/altos de VIH ADN se detectan en la primera LC-qPCR-Gag y están entre 1874 y 3367 copias/ μg ADN (de 5623 a 10100 copias/ 10^6 células). (Tablas 2 y 3.).

TABLA 2

Resultado de muestras con número de copias Medio/Alto

Muestra	N cop qPCR	Vol molde (μl)	Vol DNA / mill Cel (μl)	N cop/mill cel	Ncop/ μg DNA
E 3,0	562,3	10	100	5623	1874
E 3,4	761,4	10	100	7614	2538
E 4,0	513,3	10	100	5133	1711
E 4,4	1010	10	100	10100	3367
1 célula - 3 pg ADN; 10^6 célula = 3 μg ADN					

TABLA 3

Determinación de E de PCR-Gag. Resultados de muestras con bajo número de copias

Muestra	Nº Cop	Factor	N Cop	(Eficiencia) ³³	N Cop/ μg	N Cop/mill	N Cop /mill
	<u>10 μl PCR</u>	<u>Dilución</u>	<u>25 μl PCR Tn</u>	100	DNA	cel	cel
1	228900000	1	572250000	850500000	0,67284	2,01852	2,01852
2	868300000	1	21707500000	850500000	25,52322	76,56967	76,56967
3	37580	1	93950	850500000	0,00011	0,00033	0,00033
4	531,3	1	1328,25	850500000	0,00000	4,68519E-06	4,68519E-
5	345100000	1	8627500000	850500000	10,14403	30,43210	30,43210
6	578600	2	2893000	850500000	0,00340	0,01020	0,01020
7	107000000	2	53500000000	850500000	62,90417	188,71254	188,71254
8	740700000	2	3,7035E+11	850500000	435,44974	1306,34934	1306,34934
9	232100000	2	1,1605E+11	850500000	136,44915	409,34748	409,34748
10	606,6	2	3033	850500000	0,00000	1,06984E-05	1,06984E-
11	11440	2	57200	850500000	0,00007	0,00020	0,00020
12	978	2	4890	850500000	0,00001	1,72487E-05	1,72487E-
13	1260	2	6300	850500000	0,00001	2,22222E-05	2,22222E-
14	686	2	3430	850500000	0,00000	1,20988E-05	1,20988E-
15	617	2	3085	850500000	0,00000	1,08818E-05	1,08818E-
16	2167	2	10835	850500000	0,00001	3,82187E-05	3,82187E-
17	457200	2	2286000	850500000	0,00269	0,00806	0,00806
18	221800000	2	11090000000	850500000	13,03939	39,11817	39,11817
19	117900000	2	58950000000	850500000	69,31217	207,93653	207,93653
20	432800000	2	21640000000	850500000	25,44386	76,33158	76,33158
21	330900000	2	16545000000	850500000	19,45326	58,35979	58,35979
22	17300000	2	86500000	850500000	0,10170	0,30511	0,30511

Ejemplo 6

Modificación del método ultrasensible de PCR cuantitativa anidada utilizando una segunda pareja de cebadores distinta a la primera

Con objeto de evitar deficiencias en la detección del genoma del VIH en muestras con poca cantidad de ADN, y además simplificar el método y disminuir el tiempo de ensayo, procesando todas las muestras por igual sin tener en cuenta si podrían tener alto o bajo número de copias, se llevó a cabo otra forma preferida de realización de la invención que consiste en una PCR cuantitativa anidada.

El procedimiento consiste en realizar una PCR anidada [8] [10][11] utilizando una segunda pareja de cebadores que se unen en una zona interna del producto amplificado con los cebadores F-Gag/R-Gag de 222 pb (*Gagl*). Esta segunda pareja de cebadores, F2-Gag/R2-Gag, se unen en las secuencias que separan los oligonucleótidos F-Gag-P1-Gag, y P2-Gag-R-Gag, respectivamente, pero con una temperatura de fusión (T_m) 10°C inferior a la pareja F-Gag/R-Gag, dando un producto de 149 pb, *Gag2*. Estas diferencias en las T_m permite diseñar un programa de “PCR cuantitativa anidada” en un único capilar por muestra con una mezcla de reacción en la que están presentes las dos parejas de cebadores y las sondas. Cada 20 μ l de mezcla de reacción de LC-qPCR-Gag 2.0 contiene de 10 a 200 ng de ADN genómico como molde, 0.2 μ M de cada sonda fluorescente P1-Gag y P2-Gag, 0.05 μ M de los cebadores F-Gag y R-Gag, 0.5 μ M de los cebadores F2-Gag y R2-Gag, 0.10 mM de dATP, 0.10 mM de dCTP, 0.10 mM de dTTP, 0.10 mM de dGTP, y 1 U de enzima “LightCycler FastStart DNA polimerasa(Roche), 50 mM KCl, 3.5 mM $MgCl_2$, y 10 mM Tris-HCl (pH 8,3).

Programa LC-qPCR-Gag 2.0:

1- Desnaturalización 1:	95°C, 10 minutos.	(20°C/seg).
2-Amplificación 1,15 ciclos	95°C, 15 segundos.	(20°C/seg).
	65°C, 12 segundos.	(20°C/seg).
	72°C, 12 segundos.	(20°C/seg).
3- Desnaturalización 2:	95°C,2 minutos.	(20°C/seg).
4- Amplificación 2, 30 ciclos	92°C,4 segundos.	(20°C/seg).
<u>Medición Fluorescencia</u>	56°C, 10 segundos.	(20°C/seg).
	72°C,8 segundos.	(20°C/seg).
5- Desnaturalización final:	91°C, 10 segundos.	(20°C/seg).
	60°C, 10 segundos.	(20°C/seg).
	91°C, 1 segundo.	(0.20°C/seg).
6- Terminación programa:	40°C, 30 minutos.	

Se realiza una primera amplificación en la que hibridan en el ADN molde los cebadores F-Gag/R-Gag exclusivamente, no lo hacen los cebadores F2-Gag y R2-Gag, aunque está presente su secuencia de unión, ya que su temperatura de unión es 10°C menor que la pareja F-Gag y R-Gag. Después de los 15 ciclos de esta primera amplificación, se realiza una desnaturalización a 95°C, que es la T_m del producto *Gag1*, así se desnaturalizan los productos obtenidos en la Amplificación 1 y quedan dispuestos para que anillen los cebadores de la Amplificación 2. A continuación se inicia dicha amplificación donde la temperatura de fusión es 92°C, a la cual solo se desnaturaliza el producto *Gag2*, y no *Gagl*, de este modo el producto que se obtiene en esta amplificación sólo proviene de *Gag2*, así no se contarán varios productos provenientes del mismo ADN molde inicial. Los productos *Gagl*, no se cuantifican aunque se unan las sondas en ellos ya que al termociclador LightCycler se le programa, a través de su aplicación informática, para que sólo cuantifique fluorescencia durante la Amplificación 2 (Ver esquema en la Figura 5).

Para calcular la T_m (temperatura de fusión o desnaturalización) se aplica una fórmula que tiene en cuenta el número de bases G/C y A/T:

$$T_m = (wA+xT) * 2 + (yG+zC) * 4$$

donde w,x,y,z son el número respectivo de bases A,T,G,C en la secuencia.

En la presente invención se introdujo la secuencia en el programa de la página de internet: <http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html> y el propio programa calculó cada valor de Tm.

Cuantificación y sensibilidad

Para poder cuantificar las muestras es necesario extrapolar la fluorescencia obtenida en ellas en una recta patrón para la que se ha utilizado el plásmido pBSK-Gag que tiene clonado el producto de amplificación *Gagl*.

El mayor problema que puede presentar este método es la propia cuantificación de las muestras, ya que la cuantificación de fluorescencia se produce en la segunda amplificación, por lo tanto lo que se asocia esa fluorescencia con el producto obtenido en la primera amplificación, y no con el número de copias iniciales presentes en cada muestra. Este problema es anulado por la propia técnica de cuantificación, al referirse ésta a la recta patrón. En dicha recta patrón ocurre lo mismo que en el resto de muestras, pero al asignarle a la fluorescencia obtenida en la segunda amplificación el número de copias reales presentes al inicio de la PCR la fluorescencia extrapolada en dicha recta patrón de las diferentes muestras dará como resultado las copias iniciales presentes en cada una de ellas. En definitiva, lo que se consigue con este método es amplificar la señal de fluorescencia de cada unidad Gag, aumentando la sensibilidad del método.

Amplificación 1, número de ciclos óptimos

El aumento de sensibilidad del método viene dado por la Amplificación 1, pero si se produce una amplificación excesiva podría saturar e igualar el ADN molde para la Amplificación 2 en todas las muestras, obteniéndose número de cuentas parecido en todas las muestras aunque no todas tuviesen inicialmente cantidades similares. Para decidir el número de ciclos de la amplificación 1 que aumentan la sensibilidad del método si saturar el molde para la segunda amplificación, se realizaron varias LC-qPCR Gag 2.0 con diferentes cantidades de ADN de células 8E5 como molde, de 550 ng hasta 0.00055 ng, en diferentes repeticiones inter e intra-ensayo, concluyendo que el número de ciclos a los que se obtiene más precisión (menos error), incluso con cantidades pequeñas de ADN molde (0.55 ng por reacción) es de 15 ciclos (Tabla 4).

TABLA 4

Resultados de LC-qPCR Gag 2.0 con diferentes número de ciclos en la Amplificación 1: 20, 10 ó 15, comparados con el resultado teórico esperado. La Amplificación 2 siempre tiene 30 ciclos

<u>Resumen cuantificación Gag 2.0 en ADN de células 8E5</u>							
<u>Muestra</u>	<u>DNA total (ng)</u>	<u>Nº copias/Célula</u>					
		<u>teóricas</u>	<u>20ciclos</u>	<u>10 ciclos</u>	<u>15 ciclos</u>	<u>15ciclos</u>	<u>15ciclos</u>
E1	550	1	0,07	0,03	-	0,10	0,06
E2	55	1	0,43	0,12	0,12	0,26	0,63
E3	5,5	1	4,88	0,84	0,13	0,65	1,21
E4	0,55	1	18,82	10,20	3,85	4,02	4,97
E5	0,055	1	50,91	27,00	29,55	422,14	805,45
E6	0,0055	1	2176,36	393,64	1619,09	-	-
E7	0,00055	1	29727,27	2372,73	26681,82	-	-

Reproducibilidad

La reproducibilidad en los resultados obtenidos con este método se aprecia en la Tabla 5. La variación en los duplicados, intra-ensayo, es muy baja, excepto cuando la cantidad de ADN molde es muy baja, a partir de 0.55 ng, la variación inter-ensayo también es muy baja, no llegando a ser superior a 1 unidad hasta 0.55 ng de ADN molde, con cantidades inferiores la variabilidad es muy alta, por este motivo se han tomado como cantidades óptimas de ADN molde para este método de 5 ng a 500 ng.

TABLA 5

Datos obtenidos en 2 experimentos distintos realizados en las mismas condiciones (amplificación 1 de 15 ciclos), con las mismas muestras por duplicado en cada uno de ellos

	<u>DNA total (ng)</u>	exp 1	<u>N° copias/Célula</u> media exp 1	exp 2	media exp 2
E1a	550	0,12	0,10	0,07	0,06
E1b	550	0,09		0,06	
E2a	55	0,29	0,26	1,01	0,63
E2b	55	0,22		0,26	
E3a	5,5	0,84	0,65	1,12	1,21
E3b	5,5	0,46		1,29	
E4a	0,55	7,74	4,02	3,44	4,97
E4b	0,55	0,30		6,51	
E5a	0,055	41,92	422,14	55,45	805,45
E5b	0,055	802,36		1555,45	

a,b: duplicados

La recta patrón se obtiene como se describe en el Ejemplo 3.

Referencias

1. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. Developed by the Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection convened by the Department of Health and Human Services (DHHS). March 23, 2004.

2. Warner C. Greene and B. Matija Peterlin. 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: basis science as a passport to future therapy. *Nature Medicine*. 8 (7).

3. Yupi Zhao, Min Yu, Johann W. Miller, and Ram Yogeve. 2002. Quantification of HIV-1 proviral DNA by using Taqman Technology. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(2). p. 675-678.

4. Una O'Doherty, W. J. Swiggard, Deepa Jeyakumar, David McGain and Michael H. Malin. 2002. A sensitive, quantitative assay for HIV-1 integration. *Journal of Virology*. 76(21). p 10942-10950.

5. Scott L. Butter, Mark S.T. Hansen and Frederic D. Bushman. 2001. A quantitative assay for HIV DNA integration *in vivo*. *Nature Medicine*. 7(5).

6. L. G. Kostrikis, G. Toulomi, R. Karinicolos, and A. Hatzakis. 2002. Quantitation of HTV-1 DNA forms with the second template switch in peripheral blood cells predicts disease progression independently of plasma RNA load. 76(20), p. 10099-10108.

7. Stefan Mener, Cari Witter, Kan-Ichi Nakagawara. 2001. Rapid Cycle Real Time PCR. *Methods and Applications*. Ed. Springer.

8. A. Rolfs, I. Schuller, U. Finckh, I. Weber-Rolfs. 1992. *PCR: Clinical Diagnostics and Research*. Ed. Springer-Verlag.

9. I.A. Teo, J.W. Choi, J. Morlese, G. Taylor, S. Shaunak. 2002. LightCycler qPCR optimisation for low copy number target DNA. *J Immunology Methods*.

Descripción de las figuras

Figura 1: PCR-Gag, producto de 222 pb. Las bandas obtenidas corresponden al producto amplificado con los cebadores F-Gag y R-Gag sobre el ADN viral.

Figura 2: A) Electroforesis en gel agarosa 1% del plásmido pBSK-Gag. Se aprecian los tres conformeros, 1 lineal, 2 relajado, 3 superenrollado. B) Electroforesis en gel agarosa 2% de los productos de la PCR-Gag con cada conformero del plásmido pBSK-Gag. El marcador en los dos geles es un patrón en escalera de 100 pb en cada banda.

Figura 3: Esquema explicativo del sistema de cuantificación en muestras con bajo número de copias.

Figura 4: Gráficos de las Curva patrón pBSK-Gag de LC-qPCR Gag de la Tabla 1. Las gráficas a-f representan las curvas patrón obtenidas en diferentes experimentos y demuestran la reproducibilidad del método, el coeficiente de correlación y el error obtenido en cada uno de dichos experimentos.

Figura 5: Esquema explicativo de la doble PCR cuantitativa anidada utilizando parejas distintas de cebadores en cada paso de amplificación.

Referencias citadas en la descripción

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Literatura no patente citada en la descripción

- **Yourno et al.** *J. Clinical Microbiol.*, 1992, vol. 30, 2887-2892 [0015]
- **Warner C. Greene; B. Matija Peterlin.** Charting HIV's remarkable voyage through the cell: basis science as a passport to future therapy. *Nature medicine*, 2002, vol. 8 (7) [0061]
- **Yupi Zhao; Min Yu; Johann W. Miller; Ram Yoge.** Quantification of HIV-1 proviral DNA by using Taqman Technology. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, vol. 40 (2), 675.678 [0061]
- **Una O'Doherty; W. J. Swlggard; Deepa Jeyakumar; David McGain; Michel H. Malin.** A sensitive, quantitative assay for HIV-1 Integration. *Journal of Virology*, 2002, vol. 76 (21), 10942-10950 [0061]
- **Scott L. Butter; Mark S. T. Hansen; Frederic D. Bushman.** Aquantitative assay for HIV DNA integration *in vivo*. *Nature Medicine*, 2001, vol. 7 (5) [0061]
- **L. G. Kosirikis; G. Toulomi; R. Karinicolas; A. Hatzakis.** Quantitation of HIV-1 DNA forms with the second template swich in peripheral blood cells predics disease progression independently of plasma. *RNA load*, 2002, vol. 76 (20), 10099-10108 [0061]
- **Stefan Mener; Carl Witter; Kan-Ichi Nakagaware.** Rapid Cycle Real Time PCR. Methods and Applications. *Springer*, 2001 [0061]
- **A. Rolfs; I. Schuller; U. Finckh; I. Weber-Roles.** *PCR: Clinical Diagnostics and Research*. 1992 [0061]
- **I. A. Teo; J. W. Choi; J. Morlese; G. Taylor; S. Shaunak.** LightCycler qPCR optimisation for low copy number target DNA. *J Immunology Methods*, 2002 [0061]

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* de detección cuantitativa de ADN del virus VIH que comprende una doble amplificación del ADN viral presente en la muestra utilizando una doble PCR cuantitativa anidada, de forma que una primera pareja de cebadores de PCR, representados por SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, la cual se une específicamente al gen gag en posiciones 1260 a 1482 se utiliza en la primera amplificación, y una segunda pareja de cebadores de PCR con una temperatura de fusión (T_m) diferente a la de la primera pareja de cebadores, se une al gen gag dentro del fragmento amplificado por la primera pareja de cebadores, **caracterizado** porque la amplificación y la detección del ADN viral se lleva a cabo en un único capilar por muestra con una mezcla de reacción que contiene los dos pares de cebadores y las sondas.

2. El método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque un segundo par de cebadores SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, se unen específicamente dentro del fragmento del gen gag amplificado por la primera pareja de cebadores entre las posiciones 1286 y 1435 de dicho gen.

3. Método según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado** porque la secuencia de nucleótido de una de las sondas es la representada por SEQ ID NO: 5.

4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la secuencia de nucleótido de la segunda sonda es la representada por SEQ ID NO: 6.

5. Método según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la primera pareja de cebadores es la representada por SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, la segunda pareja de cebadores es la representada por SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 y las secuencias de nucleótidos de las sondas es la representada por SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque las sondas están marcadas con fluorocromos tipo F.R.E.T. por consiguiente el número de copias de ADN viral presente en el ensayo se cuantifica extrapolando la fluorescencia obtenida a una recta o curva patrón de referencia previamente calibrada.

7. Kit de ensayo para cuantificar ADN del virus VIH **caracterizado** porque comprende una mezcla de reacción en un único capilar que contiene:

i) al menos una primera pareja de cebadores PCR representada por SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 que se une específicamente al gen gag entre las posiciones 1260 y 1482 de dicho gen,

ii) al menos una segunda pareja de cebadores PCR representada por SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 con una temperatura de fusión (T_m) diferente de la de la primera pareja de cebadores y que se une específicamente al gen gag dentro del fragmento determinado por la primera pareja de cebadores que usa como producto de partida el previamente amplificado por dicha primera pareja de cebadores,

y, conjuntamente o por separado, en un reactivo,

iii) una pareja de cebadores que se unen específicamente al fragmento del gen gag comprendido entre el segundo par de cebadores.

8. Kit de ensayo según la reivindicación 7 **caracterizado** porque uno de los cebadores es el representado por SEQ ID NO: 5.

9. Kit de ensayo según las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizado** porque el segundo de los cebadores es el representado por SEQ ID NO: 6.

10. Kit de ensayo según las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizado** porque la primera pareja de cebadores es la representada por SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, la segunda pareja de cebadores es la representada por SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, y la pareja de sondas es la representada por SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

11. Kit de ensayo según las reivindicaciones 7 a 10, **caracterizado** porque la pareja de sondas oligonucleotídicas está marcada con fluorocromos tipo FRET.

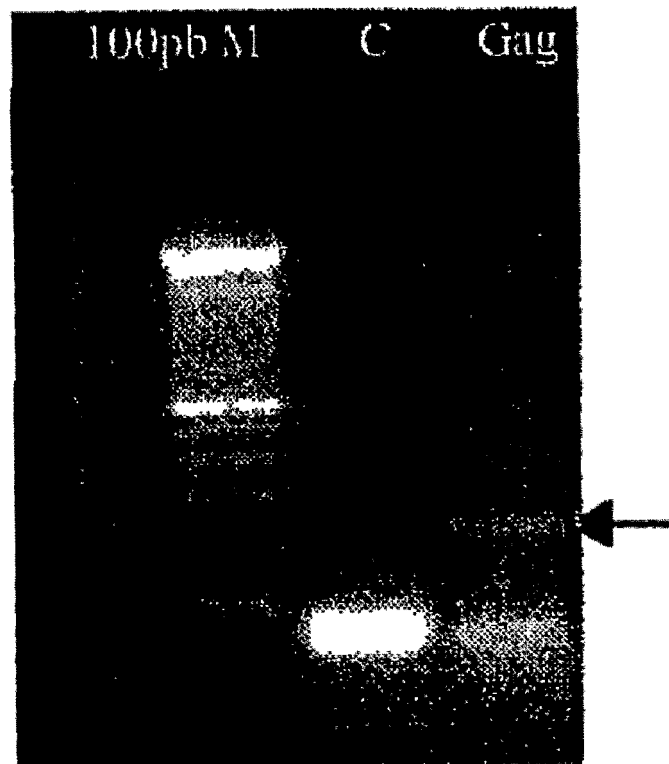


Fig. 1

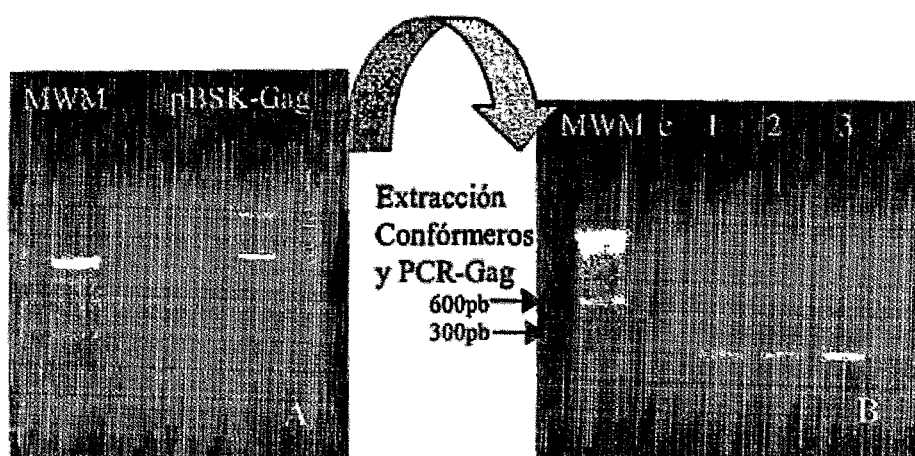
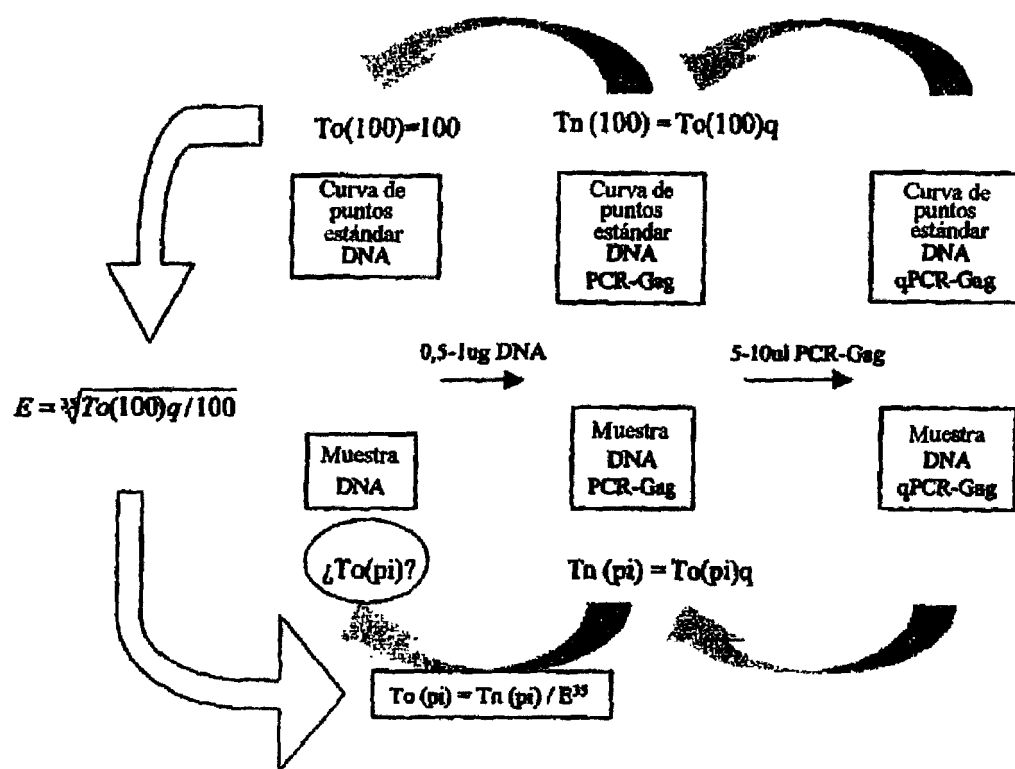


Fig. 2



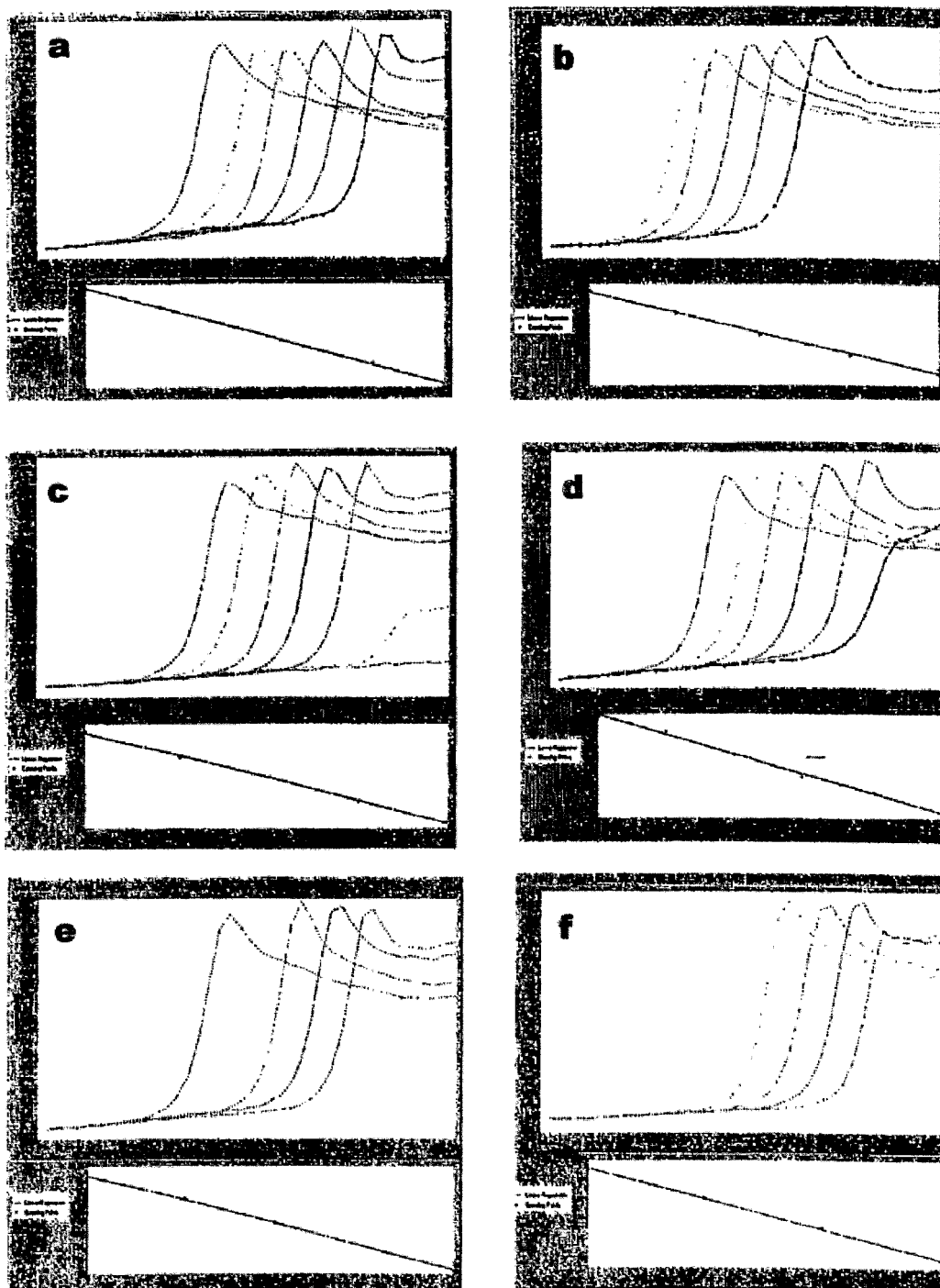


Fig. 4

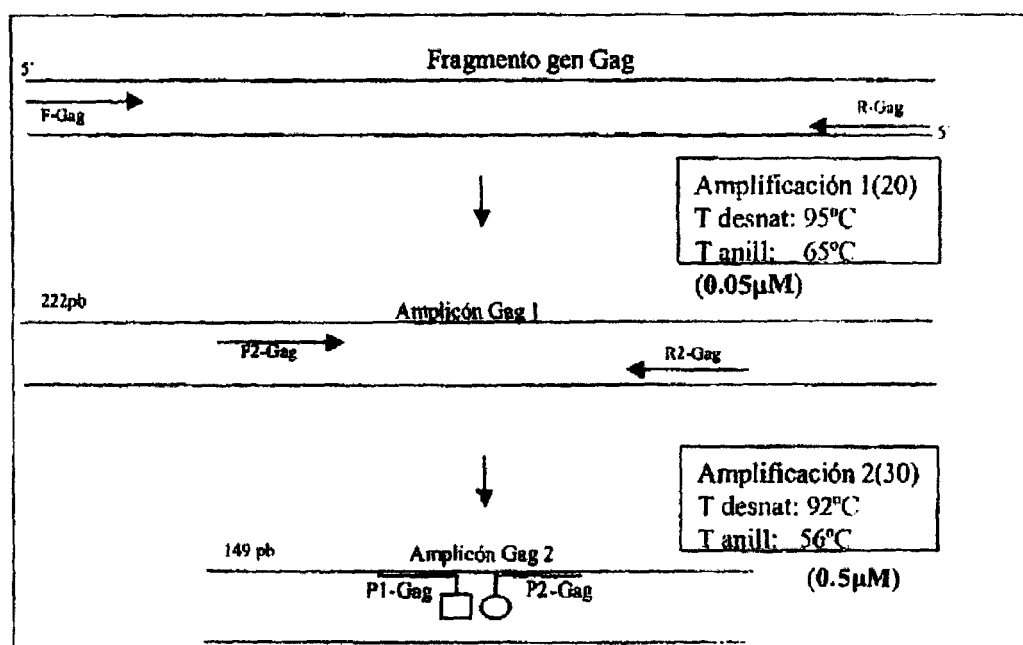


Fig. 5

ES 2 328 944 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Genomadrid
5 <120> Procedimiento de detección y cuantificación *in vitro* de ADN de VIH mediante PCR cuantitativa
<130> P-100143
<160> 6
<210> 1
10 <211> 26
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> Cebador
15 <223> F-Gag

<400> 1
20 TAGTAGAAGA GAAGGCTTTC AGCCCA

<210> 2
<211> 24
25 <213> Secuencia artificial
<220>
<221> Cebador
30 <223> R-Gag

<400> 2
35 TTGGTTCTCT CATCTGGCCT GGTG

<210> 3
<211> 36
40 <213> Secuencia artificial
<220>
<221> Cebador
<223> F-Gag-Bam
45 <400> 3

CGGGATCCCG TAGTAGAAGA GAAGGCTTTC AGCCCA
50
<210> 4
<211> 34
<213> Secuencia artificial
55 <220>
<221> Cebador
<223> R-Gag-Eco
60 <400> 4

CGGAATTCCG TTGGTTCTCT CATCTGGCCT GGTG
65 <210> 5
<211> 30

ES 2 328 944 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Sonda

5 <223> P1-Gag

<400> 5

10 GAGCCACCCC ACAAGATTTA AACACCATGT

<210> 6

<211> 29

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> Sonda

20 <223> P2-Gag

<400> 6

25 AACACAGTGG GGGGACATCA AGCAGCCAT

<210> 7

<211> 22

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> Cebador

<223> F2-Gag

35 <400> 7

GAAGTAATAC CCATGTTTTTC AG

40 <210> 8

<211> 21

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<221> Cebador

<223> R2-Gag

50 <400> 8

TGCAGAATGG GATAGATTGC A

55

60

65