



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 321 326**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/49 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06013029 .1**

(96) Fecha de presentación : **05.06.1990**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1715064**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **25.10.2006**

(54) Título: **Secuencias nucleotídicas procedentes del genoma de los retrovirus del tipo VIH-1, VIH-2 y SIV, y sus aplicaciones especialmente para la amplificación de secuencias del pol de estos genomas de estos retrovirus y para el diagnóstico *in vitro* de las infecciones debidas a estos virus.**

(30) Prioridad: **02.06.1989 FR 89 07354**
20.09.1989 FR 89 12371

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.06.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.06.2009

(73) Titular/es: **INSTITUT PASTEUR**
25-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris, FR
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)

(72) Inventor/es: **Moncany, Maurice y**
Montagnier, Luc

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Secuencias nucleotídicas procedentes del genoma de los retrovirus del tipo VIH-1, VIH-2 y SIV, y sus aplicaciones especialmente para la amplificación de secuencias del pol de estos genomas de estos retrovirus y para el diagnóstico *in vitro* de las infecciones debidas a estos virus.

La presente invención se refiere a secuencias oligonucleotídicas utilizables para la puesta en práctica de técnicas de amplificación de secuencias nucleicas específicas de retrovirus de inmunodeficiencia humana del tipo VIH o de retrovirus de inmunodeficiencia del mono del tipo SIV.

La invención se refiere en particular a la aplicación de estas secuencias a procedimientos de diagnóstico *in vitro* en el ser humano de la infección de un individuo por un retrovirus del tipo VIH (actualmente VIH-1 y/o VIH-2).

El aislamiento y la caracterización de retrovirus agrupados bajo la designación VIH-1 y VIH-2 se han descrito en las solicitudes de patente europea EP 201540 Y EP239425. Estos retrovirus se han aislado en diversos enfermos con síntomas de una linfadenopatía o de un Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

Los retrovirus del tipo VIG-2 como los retrovirus del tipo VIH-1, se caracterizan por un tropismo para los linfocitos T4 humanos y por un efecto citopatógeno respecto de estos linfocitos cuando se multiplican, para entonces causar entre otros poliadenopatías generalizadas y persistentes o un SIDA.

Otro retrovirus, denominado SIV-1, sustituyendo esta denominación la denominación anteriormente conocida de STLV-III, se ha aislado en el mono macaco rhesus (M.D. DANIEL *et al.*, Science, 228, 1201 (1985); N.L. LETWIN *et al.*, Science, 230, 71 (1985) bajo la denominación "STLV-III_{mac}").

Otro retrovirus, designado "STLV-III_{AGM}", o (SIV_{AGM}) se ha aislado en monos verdes salvajes. Pero contrariamente a los virus presentes en el mono macaco rhesus, la presencia de STLV-III_{AGM} no parece inducir una enfermedad del tipo SIDA en el mono verde africano.

Por motivos de comodidad verbal, estos virus no se designaran a continuación más que con la expresión SIV (la expresión SIV es la abreviación inglesa de "Simian Immunodeficiency Virus" (Virus de inmunodeficiencia del mono) eventualmente seguida de una abreviación que designa la especie de mono del cual proceden por ejemplo "MAC" para el macaco o "AGM" para el mono verde africano (Abreviación de "African Green Monkey").

Una cepa del retrovirus SIV-1_{mac} se ha depositado en la C.N.C.M el 7 de febrero de 1986 con el número I-521.

El seguimiento del estudio de los retrovirus VIH-1 y VIH-2 condujo también a la obtención de secuencias de ADN complementarias (ADNc) de los ARN de su genoma. La secuencia nucleotídica completa de un ADNc de un retrovirus representativo de la clase VIH-2 (VIH-2 ROD) se depositó el 21-02-1986 en la C.N.CM con el número I-522, con el nombre de referencia LAV-2-ROD.

Igualmente, la secuencia nucleotídica completa de un ADNc de un retrovirus representativo de la clase VIH-1 se describe en WAIN HONSON; SONIGO, COLE, DANOS y ALIZON en CEII (enero 1985).

Igualmente por razones de comodidad verbal, los virus del tipo VIH-1 y VIH 2 se designará a veces en este documento por la expresión VIH.

Los procedimientos de diagnóstico *in vitro* de las infecciones por virus del tipo VIH-1 o VIH-2 que existen actualmente, recurren a la detección de anticuerpos NATI-VIH-1 O ANTI-VIH-2 eventualmente presentes en una muestra biológica (biopsia) o en un fluido biológico, por ejemplo en un suero obtenido, a partir del paciente en estudio, por puesta en contacto de este fluido biológico con extractos o antígenos de VIH-1 o VIH-2, en condiciones que permiten la producción de una eventual reacción inmunológica de estos extractos o antígeno con estos anticuerpos.

Tales procedimientos de diagnóstico corren el riesgo de ser falsamente negativos, en particular en el caso de una infección reciente de un individuo por virus del tipo VIH.

Las técnicas de amplificación génica son una contribución considerable para la puesta a punto de procedimientos de diagnóstico *in vitro* particularmente sensibles de enfermedades virales. Entre estas técnicas de amplificación génica, se pueden mencionar la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction) tal como se describe en las solicitudes de patente europea EP200362 y EP229701, o también la técnica denominada "Q β replicasa" descrita en Biotecnology, vol 6 página 1197 (octubre 1988) y la que procede con la ayuda de una ARM polimerasa (T7RNA polimerasa) descrita en la solicitud de patente internacional número WO89/01050. Estas técnicas permiten mejorar la sensibilidad de detección de los ácidos nucleicos de los virus y necesitan la utilización de cebadores específicos de síntesis.

Con el fin de amplificar con la ayuda de una técnica de amplificación génica, los genes que codifican la transcriptasa inversa de los hepadnavirus HBV, WHV, GSHV y DHBV, Mack *et al.*, (1985; PNAS, 85: 6977-6981) propone mezclas constituidas por un gran número de isómeros oligonucleotídicos cuyas secuencias se han llevado a cabo para no solamente cubrir las diferencias de nucleótidos que existen entre estos diferentes hepadnavirus, sino también para tener en cuenta la degeneración del código genético.

Para la búsqueda de los virus del tipo VIH, la elección de los cebadores es problemática. En efecto, debido a la gran variabilidad de las secuencias de nucleótidos del genoma viral, un cebador conforme a la secuencia conocida de un aislado dado de un virus del tipo VIH puede fallar en la amplificación de algunas variantes virales del tipo VIH. Por otra parte, incluso si se elige un cebador en una región conservada del genoma de un virus VIH a otro, no se garantiza por este hecho su “buen funcionamiento” y puede dar lugar a malos rendimientos de amplificación.

La presente invención proporciona precisamente cebadores oligonucleotídicos que permiten, entre otros, la amplificación, en particular con fines de diagnóstico, del genoma de cualquier virus del tipo VIH y SIV, con rendimientos considerados como máximos en el estado actual de la técnica y evitando sobre todo la presencia de numerosas bandas inespecíficas.

Los cebadores de la presente invención son a la vez específicos de los virus del grupo VIH-1 y de los virus de los grupos VIH-2 y SIV, y son sensibles a las variaciones del genoma de estos virus.

La presente invención tiene por objeto cebadores oligonucleotídicos, de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos, utilizables para la amplificación genómica de los virus del tipo VIH-1 y/o del tipo VIH-2 y SIV.

La solicitud describe cualquier secuencia nucleotídica caracterizada porque su secuencia:

- bien se elige entre las que están contenidas en una de las secuencias nucleotídicas comprendidas en los genes *gen*, *vpr* y *pol* de los virus VIH-1 Bru, VIH-1 Mal, VIH-1 Eli VIH-2 ROD y SIV MAC, o en los genes *nef2*, *vif1* y *vpx* de los virus VIH-2 ROD y SIV MAC, o en los genes *env*, *nef1*, *vif1* y *vpr* de los virus VIH-1 Bru, VIH-1 Mal y VIH-1 Eli, y más particularmente entre las que están contenidas en los encadenamientos nucleotídicos definidos a continuación,
- bien (especialmente para las secuencias más largas) contiene una de las secuencias nucleotídicas anteriormente mencionadas procedentes de VIH-1 Bru, VIH-1 Mal, VIH-1 Eli VIH-2 ROD y SIV MAC, o contiene una secuencia nucleotídica complementaria de una de estas últimas secuencias, entendiéndose que los eventuales nucleótidos suplementarios que “sobresalen” de la secuencia nucleotídica del tipo en cuestión, del lado de los extremos 3' o 5', coinciden preferiblemente con los que se encuentran colocados más del lado de los extremos 5' o 3' correspondientes en el seno mismo de la secuencia completa de los virus del tipo VIH-1, VIH-2 o SIV MAC anteriormente mencionados,
- bien, si esta secuencia nucleotídica no es idéntica a una de las secuencias nucleotídicas anteriormente mencionadas, o no es complementaria de una de estas secuencias, es, sin embargo, susceptible de hibridarse con una secuencia nucleotídica procedente de los virus VIH-1 Bru, VIH-1 Mal, VIH-1 Eli, y/o con una secuencia nucleotídica procedente del virus VIH-2 ROD y SIV MAC, anteriormente mencionada. La hibridación se puede efectuar a una temperatura de 60°C+/-1°C (preferiblemente 60°C+/-0,5°C), preconizada para un rendimiento óptimo.

La numeración de los nucleótidos anteriormente mencionados corresponde a la utilizada en el manual de referencia “Human Retrovirus and AIDS-1989” editado por el “Los Alamos National Laboratory -Nuevo México- EE.UU”.

(Las secuencias de los virus VIH-1 Mal, VIH-1 Eli, se han descrito por MONTAGNIER, SONIGO, WAIN-HOBSON y ALIZON en la solicitud de patente europea nº 86.401.380 del 23-06-1986.).

Las secuencias de la invención se sintetizaron en un sintetizador comercializado por Applied Biosystems (procedimiento fósforo-amiditas, o en cualquier otro aparato que utilice un procedimiento similar.

La solicitud se refiere más particularmente a las secuencias oligonucleotídicas caracterizadas por los siguientes encadenamientos nucleotídicos (representados en el sentido 5'→3'; las iniciales “S” y “AS” indican si el oligonucleótido es con sentido o antisentido, es decir, si el oligonucleótido está orientado respectivamente en el sentido 5'→3' o en el sentido 3'→5'):

1.-) secuencias comunes a los genomas de los virus VIH-1, VIH-2 y SIV (las series de cifras espaciadas por un guión indican la posición de los nucleótidos en los genomas que corresponden respectivamente a los virus VIH-1 Bru, VIH-1 Mal, VIH-1 Eli VIH-2 ROD y SIV):

- secuencias específicas del gen *gag* del genoma de los virus anteriormente mencionados (gen que codifica un grupo de antígenos específicos del nucleótido de estos virus).

Se pueden aportar algunas variantes en algunas posiciones de las secuencias nucleotídicas indicadas anteriormente, sin que las propiedades de hibridación de estas secuencias nucleotídicas con los genes de los virus del tipo VIH y/o SIV se vean afectadas. Las secuencias nucleotídicas que comprenden estas variantes se representan debajo de las secuencias nucleotídicas iniciales de las que se derivan por sustitución de una o más bases. Las bases modificadas respecto de las de las secuencias nucleotídicas iniciales se indican con todas sus letras mientras que las bases de las secuencias iniciales que no se han sustituido en las secuencias que comprenden estas variantes se indican con la ayuda de líneas de puntos.

ES 2 321 326 T3

- La síntesis de los cebadores se hace utilizando todas las variantes simultáneamente. Es la mezcla de todas las variantes para una secuencia dada que se utiliza en los ensayos.

5 **MMy1 :** TGG CGC CCG AAC AGG GAC
... ..T.

10 S, 636-653, 635-652, 636-653, 859-876, 834-851

15 **MMy2 :** GGC CAG GGG GAA AGA AAA A
... .C. .C.
20A.

25 S, 854-872, 864-888, 848-872, 1160-1184, 1124-1148

30 **MMy3 :** TGC CCA TAC AAA ATG TTT TA
... ..C.. T.T

35 AS, 900-881, 916-897, 900-881, 1212-1193, 1176-1157

40 **MMy4 :** TGC ATG GCT GCT TGA TG
... ..AC ..G ..

45 AS, 1385-1369, 1419-1403, 1385-1369, 1703-1687, 1667-1651

50 **MMy4B :** CTT TGC ATG GCT GCT TGA TG
..CAC ..G ..

55 AS, 1388-1369, 1421-1403, 1388-1369, 1706-1687, 1670-1651,

60 **MMy4Bbis :** CAT CAA GCA GCC ATG CAA AG
..C ..GTG ..

65 S, 1369-1388, 1403-1421, 1369-1388, 1687-1706, 1651-1670,

ES 2 321 326 T3

MMy28 : AGG GCT GTT GGA AAT GTG G

... ..G ...

S, 2021-2039, 2055-2073, 2024-2042, 2329-2349, 2299-2318,

MMy28bis : CCA CAT TTC CAG CAT CCC T

... ..G ...

... ..C ...

AS, 2039-2021, 2073-2055, 2042-2024, 2349-2329, 2318-2299

- Secuencias específicas del gen vpr

MMy18 : GAT AGA TGG AAC AAG CCC CAG

S, 5590-5610, 5585-5605, 5554-5574, 6233-6296, 6147-6170,

MMy19 : TCC ATT TCT TGC TCT CCT CTG T

AS, 5870-5849, 5865-5844, 5834-5813. 6551-6531, 6454-6431,

- Secuencia específica del gen pol;

MMy29 : TAA AGC CAG GAA TGG ATG GCC CAA

... ..A. ...

S, 2620-2643, 2615-2638, 2584-2607, 2971-2994, 2887-3010

MMy29bis : TTG GGC CAT CCA TTC CTG GCT TTA

... .T.

AS, 2643-2620, 2638-2615, 2607-2584, 2994-2971, 3010-2887,

ES 2 321 326 T3

MMy30 : TGG ACT GTC AAT GAC ATA CAG AA

5 T

10 S, 3339-3361, 3334-3356, 3303-3325, 3690-3712, 3606-3628,

15 **MMy30bis : TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CA**

 T

20 AS, 3361-3339, 3356-3334, 3325-3303, 3712-3690, 3628-3606,

25 MMy31 :CAT GGG TAC CAG CAC ACA AAG G

 S, 4186-4207, 4181-4202, 4150-4171, 4534-4555, 4450-4471,

30 MMy31bis : CCT TTG TGT GCT GGT ACC CAT G

 AS, 4207-4186, 4202-4181, 4171-4150, 4555-4534, 4471-4450,

35 **MMy32 : TGG AAA GGT GAA GGG GCA GT**

 A

40 S, 4992-5011, 4987-5006, 4956-4975, 5340-5359, 5256-5275,

45 **MMy¹32bis : ACT GCC CCT TCA CCT TTC CA**

 T

50 C

55 AS, 5011-4992, 5006-4987, 4975-4956, 5359-5340, 5275-5256

60

65

ES 2 321 326 T3

2.-) Secuencias comunes a los genomas de los virus VIH-2 y SIV (las series de cifras espaciadas por un guión indican la posición de los nucleótidos en los genomas que corresponden respectivamente a los virus VIH-2 ROD y SIV-MAC).

- secuencias específicas de gen nef (que codifica un factor negativo de 27 kD)

MMy12 : AGA GAC TCT TGC GGG CGC GTG
S, 9165-9185, 9139-9159,
MMy13 : ATA TAC TTA GAA AAG GAA GAA GG
S, 9542-9564, 9516-9538,
MMy13bis : CCT TCT TCC TTT TCT AAG TAT AT
AS, 9564-9542, 9538-9516,
MMy14 : AGC TGA GAC AGC AGG GAC TTT CCA
AS, 9956-9933, 9893-9870,

- secuencias específicas de gen vif2 (que codifica un factor de infecciosidad de 23 kD)

MMy20 : TAT GGA GGA GGA AAA GAG ATG GAT AGT
S, 5424-5450, 5340-5366,
MMy21 : TAG CAC TTA TTT CCC TTG CTT T
S, 5754-5775, 5670-5691,
MMy21bis : AAA GCA AGG GAA ATA AGT GCT A
AS, 5775-5754, 5691-5670,
MMy22 : CCC TTG TTC ATC ATG CCA GTA T
AS, 6082-6061, 5995-5974,

- secuencias específicas del gen vpx (que codifica una proteína de 12 kD)

MMy23 : ATG TCA GAT CCC AGG GAG A
S, 5900-5918, 5813-5831,
MMy24 : CCT GGA GGG GGA GGA GGA GGA
AS, 6228-6208, 6141-6121,

ES 2 321 326 T3

3.-) Secuencias comunes a los genomas de los virus VIH-1 Bru, VIH-1 Mal, y VIH-1 Eli (las series de cifras espaciadas por un guión indican la posición de los nucleótidos en los genomas que corresponden respectivamente a los virus VIH-1 Bru, VIH-1 MAI y VIH-1 Eli).

- 5 • secuencias específicas del gen env (que codifica las proteínas de envoltura)

10 MMy5 : CCA ATT CCC ATA CAT TAT TGT GCC CC
 S,6905-6930,6903-6928,6860-6885

15 MMy5bis : GGG GCA CAA TAA TGT ATG GGA ATT GG
 AS, 6930-6905, 6928-6903, 6885-6860,

20 MMy6 : AAT GGC AGT CTA GCA GAA GAA GA
 S,7055-7077,7053-7075,7010-7032

25 MMy7 : ATC CTC AGG AGG GGA CCC AGA AAT T
 S, 7360-7384, 7349-7373,7306-7330

30 MMy7bis : AAT TTC TGG GTC CCC TCC TGA GGA T
 AS, 7384-7360,7373-7349,7330-7306

35 MMy8: GTG CTT CCT GCT GCT CCC AAG AAC CC
 AS, 7857-7832,7846-7821,7800-7775

40 MMy8bis : GGG TTC TTG GGA GCA GCA GGA AGC AC
 S, 7832-7857, 7821-7846, 7775-7800,

45 MMy9 : **ATG GGT GGC AAG TGG TCA AAA AGT AG**
 A
 S,8844-8869, 8836-8861, 8787-8812,

50 MMy9bis : CTA CTT TTT GAC CAC TTG CCA CCC AT
 AS, 8869-8844, 8861-8836, 8812-8787,

55 MMy78 : TAT TAA CAA GAG ATG GTG G
 S, 7629-7647, 7612-7630, 7572-7590,

60 MMy89 : CCA GCA AGA AAA GAA TGA A
 S, 8224-8242, 8213-8231, 8167-8185,

65 MMy89bis : TTC ATT CTT TTC TTG CTG G
 AS, 8242-8224, 8231-8213, 8185-8167,

- 60 • secuencias específicas del gen nef1

65 MMy10 : AAA AGA AAA GGG GGG ACT GGA
 S, 9116-9136, 9117-9137, 9062-9082,

ES 2 321 326 T3

MMMy10bis : TCC AGT CCC CCC TTT TCT TTT

AS,9136-9116, 9137-9117, 9082-9062,

MMMy11 : AAA GTC CCC AGC GGA AAG TCC C

AS,9503-9483, 9505-9484, 9449-9428,

- secuencias específicas del gen vif 1

MMMy15 : GAT TAT GGA AAA CAG ATG GCA GGT GAT

S, 5073-5099, 5068-5094, 5037-5063,

MMMy16 : GCA GAC CAA CTA ATT CAT CTG TA

S, 5383-5405, 5378-5400, 5347-5369,

MMMy16bis : TAC AGA TGA ATT AGT TGG TCT GC

AS, 5405-5383, 5400-5378, 5369-5347,

MMMy17 : CTT AAG CTC CTC TAA AAG CTC TA

AS, 5675-5653, 5670-5648, 5639-5617,

- secuencias específicas del gen vpu

MMMy25 : GTA AGT AGT ACA TGT AAT GCA ACC T

S, 6081-6105, 6076-6100, 6045-6069,

MMMy26 : AGC AGA AGA CAG TGG CCA TGA GAG

S, 6240-6263, 6238-6261, 6207-6230,

MMMy27 : ACT ACA GAT CAT CAA TAT CCC AA

AS, 6343-6321, 6338-6316, 6307-6285,

De este modo, la invención se refiere a un oligonucleótido, de 15 a 30 nucleótidos, caracterizado porque su secuencia consiste en una secuencia específica del gen *pol*, y susceptible de hibridarse a una temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ con los genomas de los virus VIH-1 Bru, VIH-1 Mal, VIH-1 Eli, VIH-2 Rod y SIV Mac; la invención tiene también por objeto las secuencias (o cebadores) que poseen una estructura nucleotídica complementaria de las de la invención.

En particular, el oligonucleótido específico del gen *pol* se elige entre

- 5'-TAA AGC CAG GAA TGG ATG GCC CAA-3',
- 5'-TAA AGC CAG GAA TGG ATG GAC CAA-3',
- 5'-TGG ACT GTC AAT GAC ATA CAGAA-3',
- 5'-TGG ACT GTC AAT GAT ATA CAGAA-3',
- 5'-CAT GGG TAC CAG CAC ACAAAG G-3',
- 5'-TGG AAA GGT GAA GGG GCA GT-3',
- 5'-TGG AAA GGT GAAGGA GCA GAT-3',
- 3'-TTG GGC CAT CCA TTC CTG GCT TTA-5',

ES 2 321 326 T3

- 3'-TTG GTC CAT CCA TTC CTG GCT TTA-5',
- 3'-TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CA-5',
- 5 - 3'-TTC TGT ATG TCA TTG ACT GTC CA-5',
- 3'-CCT TTG TGT GCT GGT ACC CAT G-5',
- 3'-ACT GCC CCT TCA CCT TTC CA-5',
- 10 - 3'-ACT GCC CCT TCT CCT TTC CA-5', y
- 3'-ACT GCC CCT TCC CCT TTC CA-5'.

15 La invención se refiere igualmente a las secuencias nucleotídicas que presentan algunas mutaciones respecto de la definidas anteriormente sin que se modifiquen las propiedades de hibridación, tal como se han definido anteriormente, de estas secuencias. El porcentaje de nucleótidos diferentes de los que constituyen las secuencias descritas anteriormente, sin afectar por ello las propiedades de hibridación de las secuencias de la invención, puede alcanzar el
20 40%.

De una manera general, en el caso de un cebador (primer) con sentido (S), se tolera un mayor número de mutaciones del lado 5' que del lado 3' del cebador, debiéndose el lado 3' hibridar perfectamente con una cadena determinada de una secuencia nucleica para permitir la amplificación de esta secuencia. en el caso de un cebador antisentido (AS), la
25 tolerancia se permite del lado 3'.

La invención tiene también por objeto los cebadores de la invención tales como los definidos anteriormente y que comprenden una conservación de al menos 5 bases de cada lado, comprendiendo la parte mediana modificaciones, sin que las propiedades de hibridación anteriores se vean afectadas.

30 Una de las características de los cebadores oligonucleotídicos de la invención es proporcionar una banda de amplificación neta, desprovista generalmente de bandas anespecíficas cuando se aplican las indicaciones técnicas de utilización descritas en la presente invención. Este hecho se debe a la longitud de los cebadores que pueden alcanzar 27 bases, lo que aumenta la especificidad de hibridación, así como a las drásticas condiciones de utilización que permiten eliminar las asociaciones parásitas. La especificidad para cada tipo de virus lo es en función, además del
35 porcentaje de homología con la matriz de referencia, de la longitud de los cebadores, que pueden alcanzar, para un rendimiento aceptable, hasta 40 bases.

La invención se extiende también a los cebadores de la invención tales como los descritos anteriormente ligados al
40 nivel de su extremo 5' a un promotor para la aplicación de un procedimiento de amplificación genómica por síntesis de múltiples copias de ADN o de ARN tal como se describe en la solicitud de patente europea EP 310229.

La invención tiene especialmente por objeto la utilización de los cebadores de la invención descritos anteriormente para la aplicación de un procedimiento de amplificación génica de secuencias nucleicas de virus del tipo VIH-1 y/o
45 VIH-2, y/o SIV, pudiéndose aplicar este procedimiento al diagnóstico *in vitro* de la potencial infección de un individuo por un virus del tipo VIH-1 y/o VIH-2 o de un animal por al menos uno de los tres virus (VIH-1, VIH-2, SIV).

Este procedimiento de diagnóstico *in vitro* se realiza a partir de una muestra biológica (por ejemplo un fluido biológico tal como suero, linfocitos de la sangre en circulación) obtenida a partir de un paciente en estudio, y comprende
50 principalmente las siguientes etapas:

- una etapa de extracción del ácido nucleico que se va a detectar perteneciente al genoma de virus de tipo VIH-1 y/o VIH-2 y/o VIS, eventualmente presente en la muestra biológica anteriormente citada y, llegado el caso, una etapa de tratamiento con ayuda de una transcriptasa inversa de dicho ácido nucleico si este
55 último está en forma de ARN, para obtener un ácido nucleico bicatenario (estando también esta última etapa designada más adelante como etapa de retrotranscripción del ARN viral)
- un ciclo que comprende las siguientes etapas:
 - desnaturalización del ácido nucleico bicatenario que se va a detectar, lo que conduce a la formación de un ácido nucleico monocatenario,
 - hibridación de cada una de las cadenas de ácido nucleico obtenidas en la etapa de desnaturalización
60 precedente con al menos un cebador según la invención, mediante la puesta en contacto de las cadenas anteriormente citadas con al menos un par de los cebadores según la invención en las condiciones de hibridación anteriormente definidas,
 - 65

ES 2 321 326 T3

- formación a partir de los cebadores de ADN complementarios con las cadenas con las que hibridan en presencia de un agente de polimerización (ADN polimerasa) y de cuatro trifosfatos de nucleósidos (dNTP) diferentes, lo que conduce a la formación de un número mayor de ácidos nucleicos bicatenarios que se van a detectar que en la etapa de desnaturalización precedente, repitiéndose este ciclo un número determinado de veces para obtener dicha secuencia nucleica que se va a detectar eventualmente presente en la muestra biológica en una proporción suficiente para permitir su detección,
- una etapa de detección de la presencia eventual del ácido nucleico que pertenece al genoma del virus de tipo VIH-1 y/o VIH-2 y/o SIV en la muestra biológica.

La etapa de hibridación anteriormente descrita se realiza ventajosamente a 60°C durante 1 minuto y 30 segundos en el tampón “10 X buffer” cuya composición (en concentración final de utilización) se indica mas adelante.

El procedimiento de diagnóstico *in vitro* se puede realizar bien a partir del ARN viral, bien a partir del ADN complementario, episomial o integrado.

En efecto, los genomas de los virus VIH y SIV se presentan en forma de ARN o de ADN en función de la localización del virus en el organismo.

Cuando el virus se sitúa en el interior de las células del organismo, especialmente en el interior de las células sanguíneas, su ARN se vuelve a copiar en ADN por una transcriptasa inversa. Por el contrario, el genoma de los virus del tipo VIH en medio extracelular, especialmente en la sangre, permanece en forma de ARN.

La etapa de extracción según la invención del ADN viral contenido en las células de la muestra biológica preconizada por los inventores -además del procedimiento clásico con fenol cloroformo- presenta las siguientes etapas:

- suspensión del residuo celular en 0,5 ml de agua pirolizada en un Potter fe pistón grande,
- trituración de las células denominado de “ida y vuelta”,
- adición Triton X100 para 1 concentración final del 0,1%
- desnaturalización con calor durante 15 a 25 minutos a 100°C,
- centrifugación corta para no eliminar más que los restos celulares,
- precipitación del ADN durante la noche a -20°C por adición de 2,5 volúmenes de etanol absoluto y del 10% del volumen final de acetato de sodio 3 molares. El ADN a continuación se recupera y se vuelve a suspender en el agua pirolizada después de haberse lavado 2 veces con etanol a 70°C. Hay que subrayar que este procedimiento permite la precipitación conjunta de los ADN y de los ARN, lo cual permite la detección del mensaje genómico de los virus de tipo VIH o SIV mediante la utilización del procedimiento denominado “PCR directo ADN” o por el denominado “PCR-ARN”.

La etapa de extracción del AAARN viral se efectúa generalmente de la manera clásica conocida por el experto en la técnica.

Después de la extracción del ARN, es necesaria efectuar una etapa suplementaria de transformación del ARN, monocatenario en ADN bicatenario cuando el diagnóstico *in vitro* se realiza a partir de muestras biológicas que contienen los virus del tipo VIH-1 y/o VIH-2 y/o SIV cuyos genomas están en forma de ARN.

Esta transformación del ARN en ADN se realiza por tratamiento del ARN obtenido después de la extracción de la muestra biológica, especialmente suero, en un medio apropiado con la ayuda de una transcriptasa inversa.

Se describe más particularmente un procedimiento de diagnóstico *in vitro* tal como se define anteriormente, en el cual la etapa de retro-transcripción del ARN viral se realiza de la siguiente manera:

- 10 µg de ARN extraído resuspendido en agua se pone en presencia del par de cebadores a la concentración de 40 µM cada uno, en un volumen final de 40 µl. El conjunto se desnaturaliza a 100°C durante 10 minutos y a continuación se sumerge en agua helada,
- se añaden 10 µl de la siguiente mezcla: 5 µl del tampón “10 buffer” descrito anteriormente + 1 unidad de transcriptasa inversa de (AMV (Avian Myeloblastosis Virus) o de MuMLV (Moloney Leukemia Virus)) + 1 unidad de Taq polimerasa + 1 µl de la mezcla de los 4 dNTP a 25 mM cada uno + agua C.S.P. 10 µl. El volumen final es por lo tanto de 50 µl.

ES 2 321 326 T3

Esta reacción se efectúa en dos etapas:

- a) primera etapa: fabricación del ADNc por acción de la transcriptasa inversa a 42°C durante 13 minutos,
- b) segunda etapa : amplificación génica clásica: se calienta a 95°C durante 3 minutos para destruir la transcriptasa inversa y permitir la etapa de deshidratación/hibridación, y a continuación se inicia el ciclo descrito anteriormente para la amplificación génica.

Se describe particularmente un procedimiento de diagnóstico *in vitro* tal como el que se describe anteriormente, en el cual la etapa de desnaturalización se realiza en presencia del (o de los pares de) cebador(es) o (primers) descritos. En efecto, como se ha precisado anteriormente, una de las características de los oligonucleótidos (o primers), descritos es proporcionar una banda de amplificación neta, generalmente desprovista de bandas inespecíficas, cuando se utilizan en las siguientes condiciones:

- *hibridación*: se ponen los cebadores (1 μ l de una solución 40 μ Molar (40 μ M) de cada cebador) en presencia de matriz de ADN (100 a 300 ng) para la primera etapa de desnaturalización-reasociación; se calienta durante 10 minutos a 100°C, después se sumergen los tubos que contienen esta mezcla de matriz de ADN y de cebadores en agua que contiene hielo, para de este modo aumentar la tasa de reasociación de matriz de ADN/cebadores. Los cebadores se deben utilizar a una concentración final en la siguiente etapa de amplificación de 0,8 μ M cada uno;
- *amplificación*: se añaden al medio precedente los 4 dNTP, utilizándose cada uno a 0,5 μ Molar en solución final (50 μ l), y una unidad de Taq polimerasa para un medio de reacción de 50 μ l. Esta etapa se realiza en un tampón de amplificación de la presente invención, generalmente designado con el nombre "10 X buffer" cuya composición (cuando se diluye a 1/10) es la siguiente: Tris-HCl, pH 8,9: 50 mM; (NH₄)₂SO₄: 15 mM; MgCl₂ : 5 mM; β -mercapto-etanol: 10 mM; gelatina: 0,25 mg/ml. Se añaden 5 μ l de este tampón y agua c.s.p. 50 μ l al medio anterior.

Los ciclos de amplificación se realizan de la siguiente manera: 30 a 40 ciclos compuestos de:

- 94°C durante 10 segundos (desnaturalización),
- 60°C durante 1 minuto (hibridación),
- 78°C durante 1 minuto 30 segundos (elongación)

El todo será seguido por un ciclo único a 78°C durante 15 minutos.

La precisión de las temperaturas indicadas a $\pm$ 0,3°C aproximadamente, así como su estabilidad durante los diferentes ciclos, representan condiciones esenciales para la obtención de los rendimientos máximos así como la ausencia de bandas inespecíficas.

La concentración óptima de ADN es de 100 a 300 ng para ADN genómico extraído de células (de pacientes o en cultivo, de mamíferos u otros).

Es evidente que las condiciones anteriores representan condiciones óptimas para un medio de reacción final de 50 μ l, y que estas condiciones se pueden modificar en función del volumen final del medio de reacción.

La utilización de diversos pares de cebadores diferentes (o cócteles de pares) permite bien la detección cruzada de diversos tipos de virus del tipo VIH y/o SIV, bien la detección simultánea de diversos genes de un mismo virus del tipo VIH y/o SIV.

A título de ejemplo de pares de cebadores preferidos utilizables en el marco de la presente invención, se pueden mencionar los siguientes pares de cebadores :

- MMy1-MMy4, MMy2-MMy4, MMy1-MMy3, MMy18-MMy19, MMy4bis-MMy28bis, MMy28-MMy29bis, MMy29-MMy30bis, MMy31-MMy32bis, especialmente para el diagnóstico *in vitro* de la infección de un individuo VIH-1 y/o VIH-2.
- MMy5-MMy8, MMy6-MMy8, MMy7-MMy8, MMy5-MMy7bis, MMy4-MMy7bis, MMy9-MMy11, MMy10-MMy11, MMy9-MMy10bis, MMy26-MMy5bis, MMy8bis-MMy9bis, MMy8bis-MMy89, MMy89bis-MMy9bis, MMy15-MMy17, MMy15-MMy16bis, MMy16-MMy17, MMy25-MMy27, MMy26-MMy27, especialmente para el diagnóstico *in vitro* de la infección de un individuo VIH-1.
- MMy20-MMy22, MMy20-MMy21bis, MMy21-MMy22, MMy23-MMy24, MMy124-MMy14, MMy12-MMy13bis, para el diagnóstico *in vitro* de la infección de un individuo VIH-2.

ES 2 321 326 T3

El agente de polimerización utilizado en la etapa de elongación del ciclo es una ADN polimerasa termoestable, especialmente Taq polimerasa, amplifiosa de la firma Appligène o cualquier ADN polimerasa termoestable que se pueda comercializar.

5 De manera general, el ciclo del procedimiento de diagnóstico *in vitro* de la invención se repite entre 30 y 40 veces.

El procedimiento de diagnóstico *in vitro* de la invención permite igualmente, en función de los pares de cebadores nucleotídicos utilizados, detectar selectivamente los genes de los virus del tipo VIH y/o SIV presentes en la muestra biológica.

10 Los pares de cebadores utilizables, a título de ejemplos, para el procedimiento de amplificación génica anteriormente mencionado, son los siguientes:

- 15 - MMy1-MMy4, MMy2-MMy4, MMy1-MMy3, MMy4bis-MMy28bis para le gen gag.
- MMy18-MMy19 para el gen vpr,
- MMy5-MMy8, MMy6-MMy8, MMy7-MMy8, MMy5-MMy7bis, MMy6-MMy7bis, MMy26-MMy5bis, MMy8bis-MMy9bis, MMy8bis-MMy89, MMy89bis-MMy9bis para el gen env,
- 20 - MMy9-MMy11, MMy9-MMy10bis, MMy10-MMy11 para el gen nef1,
- MMy15-MMy17, MMy15-MMy16bis, MMy16-MMy17, para el gen vif1,
- 25 - MMy20-MMy22, MMy20-MMy21bis, MMy21-MMy22 para el gen vif 2,
- MMy23-MMy24 para vpx,
- MMy12-MMy14, MMy12-MMy13bis, MMy13-MMy14 para el gen nef2,
- 30 - MMy25-MMy27, MMY26-MMy27 para el gen vpu,
- MMy28-MMy29bis, MMy29-MMy30bis, MMy30-MMy31bis, MMy31-MMy32bis para el gen pol.

35 En el marco de la invención unos pares de cebadores utilizados para la aplicación de una amplificación del gen *pol* de los virus de tipo VIH-1, VIH-2 y SIV consisten en :

i) MMy29-MMy30bis

- 40 5'-TAA AGC CAG GAA TGG ATG GCC CAA-3'
- 5'-TAA AGC CAG GAA TGG ATG GAC CAA-3'
- 45 3'-TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CA-5'
- 3'-TTC TGT ATG TCA TTG TACT GTC CA-5'

50 ii) Mmy30-Mmy31bis

- 5'-GG ACT GTC AAT GAC ATA CAGAA-3'
- 5'-TGG ACT GTC AAT GAT ATA CAGAA-3'
- 55 3'-CCT TTG TGT GCT GGT ACC CAT G-5'

iii) Mmy31-Mmy32bis:

- 60 5'-CAT GGG TAC CAG CAC ACAAAG G-3'
- 3'-ACT GCC CCT TCA CCT TTC CA-5'
- 65 3'-ACT GCC CCT TCT CCT TTC CA-5'
- 3'-ACT GCC CCT TCC CCT TTC CA-5'

ES 2 321 326 T3

Sin embargo, las combinaciones entre cebadores “S” y “AS” descritas anteriormente no son limitativas y se pueden variar según lo desee el usuario.

Las dimensiones de los fragmentos nucleotídicos sintetizados con la ayuda de los pares de cebadores anteriormente mencionados a título de ejemplos, se indican en las siguientes tablas I a XI:

(las cifras indicadas en las siguientes tablas representan el número de nucleótidos de los fragmentos sintetizados, y los “guiones” indican que los pares de cebadores ensayados no permiten caracterizar las cepas virales correspondientes).

TABLA I

gag			gag	
	MMy1-MMy3	MMy1-MMy4	MMy2-MMy4	MMy4bis-MMy28bis
HIV1-BRU	265	750	532	671
HIV1-MAL	282	785	556	671
HIV1-ELI	265	750	538	674
HIV2-ROD	354	845	544	663
SIV	343	844	544	668

TABLA II

env			env	
	Mmy5-Mmy7 bis	Mmy5-Mmy8	Mmy6-Mmy7 bis	Mmy6-MMy8
HIV1-BRU	480	953	330	803
HIV1-MAL	471	944	321	794
HIV1-ELI	471	941	321	791
HIV2-ROD	-	-	-	-
SIV	-	-	-	-

TABLA III

env			env
	Mmy7-Mmy8	Mmy26-Mmy5bis	Mmy8bis-Mmy9bis
HIV1-BRU	498	691	1038
HIV1-MAL	498	691	1041
HIV1-ELI	495	679	1038
HIV2-ROD	-	-	-
SIV	-	-	-

ES 2 321 326 T3

TABLA IV

env		env
	MMy8bis-MMy89	Mmy89bis-Mmy9bis
HIV1-BRU	411	646
HIV1-MAL	411	649
HIV1-ELI	411	646
HIV2-ROD	-	-
SIV	-	-

TABLA V

nef1		nef1	
	Mmy9-Mmy10bis	Mmy9-Mmy11	Mmy10-Mmy11
HIV1-BRU	293	660	388
HIV1-MAL	302	660	388
HIV1-ELI	296	663	388
HIV2-ROD	-	-	-
SIV	-	-	-

TABLA VI

nef2			nef2
	Mmy12-Mmy13bis	Mmy12-Mmy14	Mmy13-Mmy14
HIV1-BRU	-	-	-
HIV1-MAL	-	-	-
HIV1-ELI	-	-	-
HIV2-ROD	400	792	415
SIV	400	792	378

ES 2 321 326 T3

TABLA VII

vif1			vif1
	Mmy15-Mmy16bis	Mmy15-Mmy17	Mmy16-Mmy17
HIV1-BRU	333	603	293
HIV1-MAL	333	603	293
HIV1-ELI	333	603	293
HIV2-ROD	-	-	-
SIV	-	-	-

TABLA VIII

vpr		vif2	
	Mmy18-Mmy19	Mmy20-Mmy21bis	Mmy20-Mmy22
HIV1-BRU	281	-	-
HIV1-MAL	281	-	-
HIV1-ELI	281	-	-
HIV2-ROD	319	352	659
SIV	308	352	659

TABLA IX

vif2		vpx
	Mmy21-Mmy22	Mmy23-Mmy23
HIV1-BRU	-	-
HIV1-MAL	-	-
HIV1-ELI	-	-
HIV2-ROD	329	329
SIV	326	329

TABLA X

	vpu		pol
	Mmy25-Mmy27	Mmy26-Mmy27	Mmy28-Mmy29bis
HIV1-BRU	263	104	623
HIV1-MAL	263	104	584
HIV1-ELI	263	104	584
HIV2-ROD	-	-	666
SIV	-	-	712

TABLA XI

	pol		pol
	Mmy29-Mmy30bis	Mmy30-Mmy31bis	Mmy31-Mmy32bis
HIV1-BRU	742	869	826
HIV1-MAL	742	869	826
HIV1-ELI	742	869	826
HIV2-ROD	742	869	826
SIV	742	869	826

Hay que subrayar que gracias a su disposición en el genoma, los cebadores que sirven para la amplificación se pueden combinar de tal manera que se pueden utilizar como sonda, bien después del marcado con el ^{32}P por quinación, bien para la utilización en la técnica de las sondas frías para verificar la especificidad de la banda de amplificación observada durante un análisis por Southern transfert". Además, la combinación clásica de los cebadores para que un tercer oligonucleótido pueda servir de sonda interna específica, hay que subrayar el caso particular de los genes *vif1/vpr* y *vif2/vpx* debido a la imbricación de estos genes, lo cual permite una detección cruzada. Además, durante un análisis por secuenciación del ADN amplificado, estos oligonucleótidos se pueden utilizar como cebador específico para la DNA polimerasa que permite una doble secuenciación en cada sentido, por lo tanto una doble lectura de las secuencias haciendo desaparece de este modo las eventuales ambigüedades de interpretación.

La invención tiene igualmente por objeto los cebadores de la invención tal como se describen anteriormente, se marcan especialmente de manera radiactiva o enzimática, así como su utilización como sondas nucleotídicas, especialmente en el marco del procedimiento de diagnóstico *in vitro* tal como se describe anteriormente.

La invención tiene igualmente por objeto tales oligonucleótidos tal como se describen anteriormente y que comprenden azúcares en conformación α . Tales oligonucleótidos presentan la característica de invertir el sentido de la doble hélice formada con la matriz (cadena del genoma del virus), pasando de este modo esta doble hélice del estado "S" al estado "AS".

La invención se refiere igualmente a los oligonucleótidos tales como los de la invención descritos anteriormente, de los cuales algunos se metilan y/o comprenden uno o varios átomos de azufre especialmente en las adeninas. Tales oligonucleótidos presentan la característica de aumentar la estabilidad de la doble hélice, y, por consiguiente, de hibridarse mejor con la cadena de ADN que se va amplificar.

La invención se refiere igualmente a los oligonucleótidos tal como se describen anteriormente y se presentan bajo la forma denominada "de bases modificadas" que comprende nucleótidos sobre los cuales se injertan de manera covalente agentes cromóforos moléculas aromáticas planas tales como la acridina naranja), especialmente según el procedimiento descrito en el artículo de C. Hélène aparecido en "la Vie des Sciences", informes, serie general, tomo 4, n° 1, p. 17-37. Tales oligonucleótidos presentan la característica de ser fácilmente detectables, especialmente por fluorescencia.

Los oligonucleótidos de la invención se pueden utilizar también para la aplicación de un procedimiento de diagnóstico *in vitro* de la infección de monos (macacos, mono de mangabeys o mono verde) por el virus del tipo SIV, retomando este procedimiento las principales características del descrito anteriormente.

La invención tiene igualmente por objeto kits de diagnóstico par la aplicación de los procedimientos de diagnóstico *in vitro* anteriormente mencionados. A título de ejemplo, un kit de diagnóstico la presente invención comprende:

- al menos un par cebadores oligonucleotídicos según la invención, comprendiendo cada par un cebador que hibrida a una de las cadenas de la secuencia de ácido nucleico que se va a detectar, y un cebador que hibrida con la cadena complementaria de este último en las condiciones anteriormente definidas,
- reactivos apropiados para la puesta en práctica del ciclo de operaciones de amplificación, especialmente ADN polimerasa, cuatro trifosfatos de nucleótidos diferentes y el medio de reacción denominado "10 x buffer" descrito anteriormente,
- una (o más) sondas, que se puede marcar, especialmente por radiactividad o por la técnica de las sondas frías, capaz de hibridar específicamente con la(s) secuencia(s) de ácidos nucleicos amplificada(s) que se van a detectar.

La solicitud describe igualmente la utilización de los cebadores indicados con anterioridad mediante la puesta en marcha de un procedimiento de síntesis de proteínas que han sido codificadas por las secuencias nucleotídicas, amplificadas mediante dichos cebadores.

A título ilustrativo, este procedimiento de síntesis de proteínas comprende la amplificación de secuencias nucleotídicas de los genomas de los virus del tipo VIH o SIV (que codifican una proteína determinada y que han experimentado, en su caso, algunas modificaciones de sus nucleótidos) por puesta en contacto de dichas secuencias con al menos un par de cebadores según la invención en las condiciones anteriormente descritas, seguida de la traducción de estas secuencias así amplificadas en proteínas: esta última etapa se realiza especialmente por transformación de células huéspedes apropiadas con la ayuda de vectores que contienen dichas secuencias amplificadas, y recuperación de las proteínas producidas en estas células huéspedes.

La solicitud describe igualmente los polipéptidos procedentes de la traducción de las secuencias (o cebadores) nucleotídicas desveladas anteriormente.

La solicitud describe también la utilización de los cebadores oligonucleotídicos antisentido como agentes antivirales en general, especialmente en la lucha contra el SIDA, así como composiciones farmacéuticas que contienen estos cebadores antisentido en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La solicitud describe igualmente las composiciones inmunógenas que comprende uno o más productos de traducción de las secuencias nucleotídicas según la invención, y/o uno o más productos de traducción de las secuencias nucleotídicas amplificadas según los procedimientos descritos anteriormente a partir de los cebadores definidos según la invención, asociándose estos productos de traducción a un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La solicitud describe los anticuerpos dirigidos contra uno o varios de los productos de traducción descritos anteriormente (o dicho de otro modo, susceptibles de formar una reacción inmunológica con uno o varios productos de traducción de las secuencias nucleotídicas según la invención, o también uno o varios productos de traducción de las secuencias nucleotídicas amplificadas a partir de los cebadores definidos según la invención) y su utilización para la puesta en práctica de procedimientos de diagnóstico *in vitro* de la infección de un individuo por un virus del tipo VIH-1 y/o VIH-2, o de un animal por al menos uno de los tres virus (VIH-1, VIH-2, SIV) según los procedimientos conocidos por el experto en la técnica.

A título ilustrativo, tal procedimiento de diagnóstico *in vitro* comprende la puesta en contacto de una muestra biológica (especialmente suero) procedente de un paciente en estudio, con anticuerpos descritos, y la detección con la ayuda de cualquier procedimiento apropiado (especialmente con la ayuda de antiinmunoglobulinas marcadas) de los complejos inmunológicos formados entre los antígenos de los virus del tipo VIH o SIV eventualmente presentes en la muestra biológica y dichos anticuerpos.

La solicitud describe igualmente kits de diagnóstico *in vitro* que comprenden anticuerpos descritos, y en su caso, reactivos apropiados para la identificación de la reacción inmunológica formada entre dichos anticuerpos y los antígenos de los virus VIH o SIV.

La solicitud describe igualmente un procedimiento de preparación de los polipéptidos anteriormente mencionados, especialmente los que corresponden según el código genético universal a las secuencias (o cebadores) nucleotídicas descritas anteriormente, caracterizándose este procedimiento porque, partiendo preferiblemente del aminoácido C-terminal, se condensan sucesivamente de dos en dos los aminoácidos sucesivos en el orden requerido, o aminoácidos y fragmentos previamente formados y que ya contienen diversos residuos aminoácidos en el orden apropiado, o también diversos fragmentos previamente preparados de este modo, entendiéndose que se habrá tenido cuidado de proteger

ES 2 321 326 T3

previamente todas las funciones reactivas llevadas por estos aminoácidos o fragmento con la excepción de las funciones amina de uno y carboxilo del otro o viceversa, que deben intervenir normalmente en la formación de los enlaces peptídicos, especialmente después de la activación de la función carboxilo, según los procedimientos conocidos en la síntesis de los péptidos y así sucesivamente, progresivamente, hasta el aminoácido N terminal.

Por ejemplo, se recurrirá a la técnica de síntesis peptídica en solución homogénea descrita por Houbenweyl en "Methode der Organischen Chemie" (Método de la química orgánica) editado por E. Wunsch, vol. 15-I y II THIEME, STUTTGART, 1974, o a la de síntesis peptídica en fase sólida descrita por R.D. Merrifield en "Solid Phase Peptide Synthesis" (J.A.M. CHEM. SOC., 45,2149-2154).

La solicitud divulga igualmente un procedimiento de preparación de las secuencias (o cebadores) nucleotídicas descritas anteriormente, comprendiendo este procedimiento las siguientes etapas:

- incubación del ADN genómico, aislado a partir de uno de los virus del tipo VIH o SIV anteriormente mencionados, con ADNasa I, y a continuación adición de EDTA y purificación por extracción a la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25-24-1) y a continuación por éter.
- tratamiento del ADN así extraído por Eco R1 metilasa en presencia de DTT, y purificación por extracción tal como se describe anteriormente,
- incubación del ADN así purificado con los 4 trifosfatos de desoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP en presencia de T4 ADN polimerasa y de ADNligasa de *E. coli*, y a continuación purificación según el procedimiento descrito anteriormente,
- clonación de los ácidos nucleicos así obtenidos en un vector apropiado y la recuperación del ácido nucleico buscado con la ayuda de una sonda apropiada.

Un procedimiento de preparación particularmente ventajoso de las secuencias nucleotídicas comprende las siguientes etapas:

- la síntesis de ADN utilizando el procedimiento automatizado de las β -cianetil fosforamiditas descrita en Bioorganic Chemistry 4; 274-325 (1986),
- la clonación de los ácidos nucleicos así obtenidos en un vector apropiado y la recuperación del ácido nucleico por hibridación con una sonda apropiada.

Otro procedimiento de preparación de las secuencias nucleotídicas comprende las siguientes etapas:

- el ensamblado de los oligonucleótidos químicamente sintetizados, provistos en sus extremos de sitios de restricción diferentes, cuyas secuencias son compatibles con el encadenamiento de aminoácidos del polipéptido natural según el principio descrito en Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 80; 7461-7465, (1983),
- la clonación de los ácidos nucleicos obtenidos en un vector apropiado y la recuperación del ácido nucleico buscado por hibridación con una sonda apropiada.

REIVINDICACIONES

1. Oligonucleótido, de 15 a 30 nucleótidos, **caracterizado** porque su secuencia consiste en:

- i) una secuencia específica del gen *pol*, y susceptible de hibridarse a una temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ con los genomas de los virus VIH-1 Bru, VIH-1 Mal, VIH-1 Eli, VIH-2 Rod y SIV Mac; o
- ii) una secuencia complementaria de una secuencia tal como se define en i).

2. Oligonucleótido, de 15 a 30 nucleótidos, **caracterizado** porque su secuencia nucleotídica se modifica respecto de la secuencia del oligonucleótido según la reivindicación 1 y mantiene las propiedades de hibridación con los genomas de los virus VIH-1 Bru, VIH-1 Mal, VIH-1 Eli, VIH-2 Rod y SIV Mac a una temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

3. Oligonucleótido según la reivindicación 2, cuyas 5 bases de cada extremo se conservan respecto de las de un cebador oligonucleotídico tal como se describe en la reivindicación 1, y que comprende en su parte mediana modificaciones respecto de la secuencia de un cebador oligonucleotídico según la reivindicación 1.

4. Oligonucleótido específico del gen *pol* según la reivindicación 1 elegido entre

- 5'-TAA AGC CAG GAA TGG ATG GCC CAA-3',
- 5'-TAA AGC CAG GAA TGG ATG GAC CAA-3',
- 5'-TGG ACT GTC AAT GAC ATA CAGAA-3',
- 5'-TGG ACT GTC AAT GAT ATA CAGAA-3',
- 5'-CAT GGG TAC CAG CAC ACAAAG G-3',
- 5'-TGG AAA GGT GAA GGG GCA GT-3',
- 5'-TGG AAA GGT GAAGGA GCA GT-3',
- 3'-TTG GGC CAT CCA TTC CTG GCT TTA-5',
- 3'-TTG GTC CAT CCA TTC CTG GCT TTA-5',
- 3'-TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CA-5',
- 3'-TTC TGT ATG TCA TTG ACT GTC CA-5',
- 3'-CCT TTG TGT GCT GGT ACC CAT G-5',
- 3'-ACT GCC CCT TCA CCT TTC CA-5',
- 3'-ACT GCC CCT TCT CCT TTC CA-5', y
- 3'-ACT GCC CCT TCC CCT TTC CA-5'.

5. Par de cebadores oligonucleotídicos, para llevar a cabo una amplificación génica del gen *pol* de virus de tipo VIH-1, VIH-2 y SIV, consistiendo los cebadores cada uno en:

- i) una secuencia específica del gen *pol* de 15 a 30 nucleótidos, y susceptible de hibridar a una temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ con los genomas de los virus VIH-1 Bru, VIH-1 Mal, VIH-1 Eli, VIH-2 Rod o VIS Mac, o
- ii) una secuencia complementaria de una secuencia tal como se define en i).

6. Par de cebadores **caracterizado** porque la secuencia de al menos un cebador oligonucleotídico de un par de cebadores según la reivindicación 5 se modifica respecto de la secuencia del gen *pol* de los virus VIH-1 Bru, VIH-1 Mal, VIH-1 Eli, VIH-2 Rod o VIS Mac, y conserva las propiedades de hibridación con los genomas de los virus VIH-1 Bru, VIH-1 Mal, VIH-1 Eli, VIH-2 Rod y VIS Mac, a una temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

7. Par de cebadores según la reivindicación 5, para llevar a cabo una amplificación génica del gen *pol* de virus de tipo VIH-1, VIH-2 y SIV, consistiendo los cebadores en :

ES 2 321 326 T3

i. al menos una mezcla elegida en el grupo de las siguientes mezclas de secuencias sentido:

Mmy29: Mezcla constituida de las secuencias

5'-TAA AGC CAG GAA TGG ATG GCC CAA-3'

5'-TAA AGC CAG GAA TGG ATG GAC CAA-3'

Mmy30: Mezcla constituida de las secuencias

5'-TGG ACT GTC AAT GAC ATA CAGAA-3'

5'-TGG ACT GTC AAT GAT ATA CAGAA-3'

Mmy31: Mezcla constituida de la secuencia

5'-CAT GGG TAC CAG CAC ACAAAG G-3'

Mmy32: Mezcla constituida de las secuencias

5'-TGG AAA GGT GAA GGG GCA GT-3'

5'-TGG AAA GGT GAAGGA GCA GT-3', y

ii) al menos una mezcla elegida en el grupo de las siguiente mezclas de secuencias antisentido:

Mmy29bis: Mezcla constituida de las secuencias

3'-TTG GGC CAT CCA TTC CTG GCT TTA-5'

3'-TTG GTC CAT CCA TTC CTG GCT TTA-5'

Mmy30bis: Mezcla constituida de las secuencias

3'-TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CA-5'

3'-TTC TGT ATG TCA TTG ACT GTC CA-5'

Mmy31 bis: Mezcla constituida de la secuencia

3'-CCT TTG TGT GCT GGT ACC CAT G-5'

Mmy32bis: Mezcla constituida de las secuencias

3'-ACT GCC CCT TCA CCT TTC CA-5'

3'-ACT GCC CCT TCT CCT TTC CA-5'

3'-ACT GCC CCT TCC CCT TTC CA-5'.

8. Par de cebadores según la reivindicación 7, para llevar a cabo una amplificación génica del gen *pol* de virus de tipo VIH-1, VIH-2 y SIV, que consisten en :

i) Mmy29-Mmy30bis

5'-TAA AGC CAG GAA TGG ATG GCC CAA-3'

5'-TAA AGC CAG GAA TGG ATG GAC CAA-3'

3'-TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CA-5'

3'-TTC TGT ATG TCA TTG ACT GTC CA-5'

ES 2 321 326 T3

ii) Mmy30-Mmy31 bis

5'-TGG ACT GTC AAT GAC ATA CAGAA-3'

5'-TGG ACT GTC AAT GAT ATA CAGAA-3'

3'-CCT TTG TGT GCT GGT ACC CAT G-5'

iii) Mmy31-Mmy32bis:

5'-CAT GGG TAC CAG CAC ACAAAG G-3'

3'-ACT GCC CCT TCA CCT TTC CA-5'

3'-ACT GCC CCT TCT CCT TTC CA-5'

3'-ACT GCC CCT TCC CCT TTC CA-5'.

9. Oligonucleótido o par de cebadores oligonucleotídicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, susceptible de hibridar con los genomas de los virus VIH-1 Bru, VIH-1 Mal, VIH-1 Eli, VIH-2 Rod y VIS Mac en un tampón 10 x buffer de composición Tris-HCl, pH 8,9: 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 15 mM, MgCl_2 : 5 mM, β -mercaptoetanol: 10 mM, gelatina: 0,25 mg/ml.

10. Procedimiento de amplificación génica de secuencias nucleicas del gen *pol* de virus de tipo VIH-1 y/o VIH-2 y/o VIS, realizado a partir de una muestra biológica, comprendiendo este procedimiento principalmente las siguientes etapas:

a) una etapa de extracción del ácido nucleico que se va a detectar perteneciente al genoma del virus de tipo VIH-1, VIH-2 o VIS, eventualmente presente en la muestra biológica anteriormente citada y, en su caso, una etapa de tratamiento con ayuda de una transcriptasa inversa de dicho ácido nucleico si este último está en forma de ARN,

b) un ciclo que comprende las siguientes etapas:

- desnaturalización del ácido nucleico bicatenario que se va a detectar, lo que conduce a la formación de un ácido nucleico monocatenario,
- hibridación de cada una de las cadenas de ácido nucleico obtenidas en la etapa de desnaturalización precedente con al menos un cebador oligonucleotídico o un par de cebadores oligonucleotídicos según una de las reivindicaciones 1 a 9, mediante la puesta en contacto de las cadenas anteriormente citadas con al menos un par de cebadores oligonucleotídicos anteriormente citados,
- formación a partir de los cebadores de ADN complementarios con las cadenas con las que hibridan en presencia de una ADN polimerasa y de cuatro trifosfatos de nucleósidos (dNTP) diferentes, lo que conduce a la formación de un número mayor de ácidos nucleicos bicatenarios que se van a detectar que en la etapa de desnaturalización precedente,

repitiéndose este ciclo un número determinado de veces para obtener dicha secuencia nucleica que se va a detectar eventualmente presente en la muestra biológica en una proporción suficiente para permitir su detección,

c) una etapa de detección de la eventual presencia del ácido nucleico que pertenece al genoma del virus de tipo VIH-1, VIH-2 y/o VIS en la muestra biológica.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** porque la etapa de desnaturalización se realiza en presencia del (o de los) par(es) de cebadores oligonucleotídicos según una de las reivindicaciones 6 a 9.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque se realiza en las siguientes condiciones:

- a) hibridación: se ponen los cebadores oligonucleotídicos (1 μl de una solución 40 μmolar de cada cebador) en presencia de matriz de ADN (100 a 300 ng) para la primera etapa de desnaturalización-reasociación; se calienta durante 10 minutos a 100°C, después se sumergen los tubos que contienen esta mezcla de matriz de ADN y de cebadores en agua que contiene hielo. Los cebadores se deben utilizar a una concentración final en la siguiente etapa de amplificación de 0,8 μM cada uno;
- b) amplificación: se añaden al medio precedente los 4 dNTP, utilizándose cada uno a 0,5 μmolar en la solución final (50 μl), y una unidad de Taq polimerasa para un medio de reacción de 50 μl .

ES 2 321 326 T3

13. Aplicación del procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 en el diagnóstico *in vitro* de infección de un individuo por un virus de tipo VIH-1 y/o VIH-2 o de un animal por al menos uno de los tres virus (VIH-1, VIH-2, VIS).

- 5 14. Kit para la puesta en práctica de un procedimiento según una de las reivindicaciones 10 a 12 que comprende:
- i) al menos un cebador oligonucleotídico o un par de cebadores oligonucleotídicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,
 - 10 ii) reactivos apropiados para la puesta en práctica del ciclo de operaciones de amplificación, especialmente ADN polimerasa, cuatro trifosfatos de nucleótidos diferentes y el tampón 10 x buffer de composición Tris-HCl, pH 8,9: 50 mM; (NH₄)₂SO₄: 15 mM; MgCl₂: 5 mM, β -mercaptoetanol: 10 mM; gelatina: 0,25 mg/ml. (en concentración final de utilización),
 - 15 iii) una (o más) sondas, que puede estar marcada, capaz de hibridar con la(s) secuencia(s) de ácido nucleico amplificada(s) que se van a detectar.

20 15. Utilización de al menos un cebador oligonucleotídico o de un par de cebadores oligonucleotídicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la amplificación génica de secuencias nucleicas del gen pol de virus de tipo VIH-1 y/o VIH-2 y/o VIS.

25

30

35

40

45

50

55

60

65