



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 357 821**

② Número de solicitud: 200930425

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **07.07.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
03.05.2011

⑦ Solicitante/s:
Universidad Politécnica de Cartagena (Titular al 70 %)
Plaza del Cronista Isidoro Valverde
Edif. La Milagrosa
30202 Cartagena, Murcia, ES
FUNDACIÓN PARA LA FORMACIÓN E
INVESTIGACIÓN SANITARIA (Titular al 30 %)

⑧ Inventor/es: **Santaclara Maneiro, Vicente;**
Pérez-Guillermo García, Miguel;
Egea Gutiérrez-Cortines, Marcos;
Conesa Zamora, Pablo;
Weis, Julia y
Iniesta Navalón, Carles

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑮ Título: **Método para la detección y determinación de carga viral del virus del papiloma humano.**

⑯ Resumen:

Método para la detección y determinación de carga viral del virus del papiloma humano.

Un par de cebadores degenerados capaces de amplificar un fragmento del gen L1 de varios genotipos del virus del papiloma humano (VPH) y un método de detección y de cuantificación de la carga viral del VPH en muestras biológicas aisladas, que comprende: la extracción de ADN de una muestra biológica aislada, poner en contacto la muestra con una mezcla de reacción que contiene al menos un fluorocromo y los cebadores degenerados de la invención, amplificar un fragmento del gen L1 del VPH, medir la fluorescencia obtenida en el paso de amplificación y comparar el valor de fluorescencia obtenido con una secuencia control.

ES 2 357 821 A1

DESCRIPCIÓN

Método para la detección y determinación de carga viral del virus del papiloma humano.

5 La presente invención se encuadra en el campo de la biología molecular y de la medicina, y se refiere a un par de cebadores degenerados capaces de amplificar un fragmento del gen L1 de varios genotipos del virus del papiloma humano (VPH). También se refiere a un método de detección y de cuantificación de la carga viral del VPH en muestras biológicas aisladas. Además, la presente invención de refiere a un kit que comprende los cebadores mencionados y otros componentes para llevar a cabo dicho método.

10

Estado de la técnica anterior

15 La infección por virus del papiloma humano (VPH) es una de las causas principales de desarrollo de carcinoma de cuello uterino, además de ser el agente responsable de una de las enfermedades de transmisión sexual más frecuentes en el mundo. Se han descrito más de 120 tipos de VPH que se han clasificado desde el punto de vista oncogénico y filogenético en dos grupos, de alto y de bajo riesgo. Dentro de las especies de alto riesgo, algunas variantes del género Alfa-papilomavirus se consideran la causa directa del carcinoma de cérvix. Existen tres parámetros asociados al virus que son considerados de importancia en el desarrollo de cáncer: el genotipo viral, el estado del virus en la célula y la carga viral de ciertos tipos del virus como el VPH 16 o el VPH 58, cuyos valores se piensa que pueden ser de utilidad en el pronóstico del cáncer.

20

La introducción de métodos moleculares en el diagnóstico del VPH y la caracterización de las cepas han contribuido al conocimiento de la infección. En este sentido, existen varios métodos de detección del VPH. El más empleado es la detección de secuencias de ADN del virus, que se puede llevar a cabo, entre otras técnicas, mediante PCR.

25

La PCR presenta la ventaja de poder detectar, en una sola amplificación, varios genotipos del VPH si se amplifican regiones conservadas del virus, pero presenta el inconveniente de que, tras la amplificación, la tipificación viral se ha de realizar con sondas específicas para cada genotipo.

30 Los cebadores empleados en esta técnica de detección por PCR pueden ser específicos de cada cepa o universales o de amplio espectro. La PCR de tipo específico presenta el inconveniente de que para detectar diferentes genotipos del virus se han de realizar múltiples reacciones de PCR, por lo que la estandarización del método suele ser compleja. La PCR de amplio espectro suele estar diseñada para amplificar la región L1 del genoma del virus, por ser una de las más conservadas. Para llevar a cabo esta última se han diseñado diversos cebadores. En primer lugar, los que incluyen varias parejas de cebadores que contienen una o más posiciones degeneradas, como es el caso del sistema MY09/MY11 (Karin Biedermann *et al.*, 2004, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42, No. 8: 3758-3765). No obstante, dado el gran tamaño del producto de su amplificación (450 pares de bases), en los casos en los que se dispone de ADNs de mala calidad la amplificación se ve muy limitada. Por este motivo, en base a esta misma diana L1, se han realizado sucesivas modificaciones de la técnica que han pretendido sustituir MY09/MY11 por un conjunto de cebadores. Dentro de estos nuevos cebadores se encuentran los cebadores Primer General (GP) 5+/6+, diseñados sobre regiones conservadas pero que sólo hibridan completamente con algunos tipos de VPH (Markus Schmitt *et al.*, 2008, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 46, No. 3: 1050-1059). Otra aproximación consiste en combinar una serie de parejas de cebadores diferentes que se unen a las mismas posiciones del genoma y que a menudo contienen inosina en sus secuencias. Ejemplos de este tipo de cebadores son PGMY y SPF (François Coutlée *et al.*, 2002, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 40, No. 3: 902-907).

45

Existen sistemas de PCR de amplio espectro basados en el diseño de cebadores para otras regiones del genoma, como E1, aunque su uso no se ha generalizado en los laboratorios y es necesario incluir, adicionalmente, cebadores específicos junto con los degenerados en las mezclas de reacción (Agnetha Josefsson *et al.*, 1999, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 37, No. 3: 490-496).

50

En todos los sistemas de detección basados en PCR con cebadores degenerados, la eficiencia de amplificación de los diversos genotipos no es igual sino que depende del grado de identidad de la secuencia del VPH y del cebador. Asimismo, en muestras con múltiples genotipos de VPH, la amplificación de los mismos depende de la carga viral de cada uno de ellos, pudiendo quedar enmascarados aquellos con cargas virales bajas (Silvia de Sanjosé Llongueras *et al.*, 2006, *4º Monografía de la Sociedad Española de Epidemiología*).

55

La técnica de PCR en tiempo real (Q-PCR) se ha introducido en los últimos años en el diagnóstico molecular del VPH como herramienta para la determinación cuantitativa de la carga viral, así como para el diagnóstico de la infección. La detección en tiempo real de los productos amplificados puede llevarse a cabo mediante la utilización de moléculas fluorescentes que se intercalan en el ADN de cadena doble o mediante hibridación con diferentes tipos de sondas. La utilización de sondas mejora la especificidad de la reacción, sin embargo, la identificación de los diversos genotipos del VPH mediante esta técnica es compleja, ya que requiere la especificidad genotípica de las sondas empleadas. Varios sistemas basados en esta tecnología están o estarán disponibles en el mercado, si bien es necesaria una validación adecuada de los mismos.

65

Tanto los sistemas de amplificación del VPH de amplio espectro como los sistemas específicos de genotipo han sido adaptados a PCR en tiempo real. Así, se han desarrollado procedimientos de Q-PCR con sondas *Taqman* para

detectar y cuantificar diferentes tipos de VPH, basados en la actividad 5' exonucleasa de la polimerasa *Taq* (Martin Moberg *et al.*, 2003, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 41, No. 7: 3221-3228). Este método permite estimar la carga viral de los genotipos más frecuentes de VPH, sin embargo, cada reacción incluye un conjunto de cebadores y de sondas específicas, por lo que es necesaria la aplicación de un software capaz de detectar diferentes fluorocromos en la misma reacción de PCR. Además, la cantidad de genotipos virales que se pueden detectar mediante este sistema depende del número de sondas específicas que se incluyan en la reacción.

Otro tipo de Q-PCR empleada para la cuantificación de carga viral es la basada en SYBR Green. Uno de los ensayos realizados en este sentido utiliza el par de cebadores universales MY11/MY09, junto con pares de cebadores específicos, para detectar y cuantificar VPH 16 y 18 (Karin Biedermann *et al.*, 2004, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42, No. 8: 3758-3765). Por lo tanto, la utilización de estos dos cebadores degenerados requiere adicionalmente un conjunto de cebadores específicos para poder llevar a cabo la amplificación y cuantificación. Además, las técnicas basadas en este tipo de reacciones de Q-PCR SYBR Green normalmente consisten en una primera reacción de PCR convencional que permite la detección cualitativa del virus y posteriormente una PCR con cebadores específicos de genotipo para su detección cuantitativa.

Por otro lado, se han empleado cebadores fluorescentes unidos a sondas, los denominados cebadores *Scorpions*, para estimar la carga viral de VPH en una técnica que se conoce como VESPA (Keith W. Hart *et al.*, 2001, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 39, No. 9: 3204-3212). La carga viral por célula se determina mediante la cuantificación de un gen control. El principal inconveniente que presenta este sistema es que las secuencias de los cebadores son específicas de cada genotipo. Por ello, para ampliar el espectro de genotipos virales que pueden reconocer estos cebadores, se ha diseñado una mezcla de cebadores *Scorpions* degenerados. No obstante, ello requiere un procedimiento de dos pasos consistente en una primera amplificación para insertar una secuencia consenso en el fragmento amplificado, que proporciona una diana única de reconocimiento, y una segunda reacción donde el cebador *Scorpion* reconoce dicha secuencia independientemente del tipo viral que la porte.

Los métodos existentes para llevar a cabo una determinación de la carga viral de VPH requieren el empleo de conjuntos de cebadores, específicos y/o degenerados, y en algunos casos de sondas específicas de cada genotipo, lo que supone cierta complejidad en los métodos y en las mezclas de reacción. Además, los cebadores universales diseñados hasta la fecha no amplifican con la misma eficiencia los distintos genotipos de VPH, lo que impide la estandarización de las técnicas.

Debido a la variabilidad genética entre las distintas cepas del virus, los métodos de diagnóstico de la infección deben ser diseñados de forma que sean capaces de detectar el mayor número de genotipos posibles. Además, deben poder realizarse con facilidad, con alta reproducibilidad y elevada especificidad y sensibilidad.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un par de cebadores degenerados, capaces de amplificar un fragmento del gen L1 de varios genotipos del virus del papiloma humano (VPH), y un método de detección y cuantificación de la carga viral del VPH en muestras biológicas aisladas. Los cebadores degenerados han sido diseñados a partir de la familia de cebadores SPF previamente descritos para detección de VPH y son capaces de amplificar, con eficiencias similares, un fragmento de 22 pares de bases del gen L1 de varios genotipos del virus, lo que permite detectar y cuantificar VPH en las muestras en una sola reacción independientemente de cuál sea el genotipo que las infecta, sin necesidad de realizar un genotipado previo del virus, de emplear sondas y/o cebadores específicos de tipo o de usar conjuntos de cebadores (específicos o degenerados) que permitan amplificar diferentes cepas del virus.

Estos cebadores usados en una reacción adecuada, por ejemplo pero sin limitarnos, Q-PCR SYBR Green, permiten la cuantificación de la carga viral en la muestra de los principales tipos de VPH implicados en el desarrollo de cáncer cervical lo que supone, además de un método de diagnóstico, una técnica de gran utilidad en futuras investigaciones que estudien la relación entre la carga viral y el proceso canceroso. Además, el método proporcionado por la invención puede ayudar a conseguir una estimación más precisa de la carga viral por célula.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de detección y cuantificación de la carga viral del VPH, de ahora en adelante "método de la invención", que comprende:

- a. la extracción de ADN de una muestra biológica aislada,
- b. poner en contacto la muestra del paso (a) con una mezcla de reacción que contiene al menos un fluorocromo y los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2,
- c. amplificar un fragmento del gen L1 del VPH,
- d. medir la fluorescencia obtenida en la amplificación del paso (c), y
- e. comparar el valor de fluorescencia obtenido en el paso (d) con una secuencia control.

ES 2 357 821 A1

En una realización preferida de este aspecto de la invención la muestra biológica aislada del paso (a) es una muestra humana procedente del cuello del útero. En otra realización preferida, el fluorocromo del paso (b) es SYBR Green. En otra realización preferida, la amplificación del paso (c) se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Q-PCR). En otra realización preferida, la secuencia control del paso (e) es el gen PSA.

En la presente descripción se entiende por “VPH o virus del papiloma humano” el virus de ADN que infecta la piel y las membranas mucosas de humanos así como de algunos otros animales. Es un virus estable, de tamaño pequeño, no encapsulado, con una estructura icosaédrica y una doble cadena de ADN circular de 7.500 a 8.000 pares de bases. Este virus pertenece a la familia de los *Papovaviridae*, incluida en el género *Papillomavirus*. Su genoma consta de tres regiones: E, L y regiones no codificantes. La región L, preferiblemente la L1, es la que se amplifica mediante el método de la invención.

Una muestra biológica aislada incluye, pero sin limitarnos, a células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. La muestra biológica aislada del paso (a) puede proceder, sin limitarnos, de cualquier mamífero, aunque, preferiblemente, procede del cuello del útero de una hembra humana. Se entiende por “cuello del útero o cérvix uterino” la porción fibromuscular inferior del útero que se proyecta dentro de la vagina. La obtención de la muestra biológica humana procedente del cuello del útero se puede realizar mediante, por ejemplo, pero sin limitarnos, citología.

La extracción de ADN de una muestra biológica se puede realizar mediante métodos y protocolos conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo, pero sin limitarnos, *QIAmp ADN kit*, *Qiagen, Hilden, Germany*; *ADN isolation Kit*, etc.

El ADN extraído se puede amplificar, por ejemplo, pero sin limitarnos, en una reacción de PCR en tiempo real o Q-PCR, que consiste en una técnica de PCR basada en la monitorización de los productos obtenidos mediante técnicas de fluorescencia. En la presente descripción se entiende por “fluorocromo” cualquier molécula fluorescente que absorbe energía de una longitud de onda específica y la vuelve a emitir en otra determinada de mayor longitud de onda. Las técnicas de visualización por fluorescencia que pueden ser empleadas en el método de la invención podrían consistir por ejemplo, pero sin limitarnos, en sondas etiquetadas con fluorocromos, sondas de hidrólisis, *molecular beacons*, SYBR Green, etc. El SYBR Green se define como un agente intercalante, no específico de secuencia, utilizado en la tinción del ADN por su capacidad de unión al ADN de doble hélice, lo que provoca el incremento de su tasa de emisión fluorescente, de manera que cuando se encuentra libre en el medio no emite fluorescencia pero sí cuando se une a ADN de doble banda.

Un “cebador” es una secuencia de un oligonucleótido específico complementario a una secuencia nucleotídica diana con la que es capaz de hibridar y servir como punto de iniciación para una polimerización nucleotídica catalizada por ARN polimerasa, ADN polimerasa o transcriptasa reversa.

Para amplificar un fragmento nucleotídico por PCR, son necesarios dos cebadores, uno de ellos se unirá a la hebra molde (cebador directo) y el otro a la hebra complementaria (cebador reverso), en una posición que permita obtener, mediante sucesivas amplificaciones con una enzima ARN/ADN polimerasa termorresistente, un fragmento que pueda ser detectado y/o cuantificado.

Los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 de la invención están degenerados. Se entiende por “cebador degenerado” aquel cebador que posee en su secuencia una o más posiciones específicas degeneradas, es decir, que pueden ser ocupadas por varias bases nitrogenadas indistintamente, lo que le permite hibridar con distintas secuencias nucleotídicas diana. Así, los cebadores de la mezcla de reacción del paso (b) del método de la invención son capaces de amplificar una región de 22 pares de bases del gen L1 de varios genotipos de VPH, por ello son de utilidad para la detección y cuantificación de la carga viral de diferentes cepas del virus. Dicho gen L1 codifica para la proteína principal de la cápsida del virus.

Como resultado de la Q-PCR SYBR Green se obtiene una curva de fluorescencia, correspondiente a la curva de amplificación, que puede ser medida, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante un software, para cuantificar la carga viral de la muestra amplificada.

Posteriormente al paso de medida de la fluorescencia obtenida en la reacción de amplificación, es imprescindible normalizar este valor con respecto al genoma de la célula, lo cual puede realizarse comparando el número de copias del virus con una secuencia control presente en las células de la muestra analizada, para que los datos obtenidos posean valor diagnóstico. Se entiende por “secuencia control” cualquier secuencia de nucleótidos presente en el genoma de la célula que puede ser amplificada, y por tanto detectada y/o cuantificada, mediante la hibridación de un par de cebadores específicos de secuencia. Para ello, se puede seleccionar, por ejemplo pero sin limitarnos, cualquier gen de secuencia conocida de la célula, “secuencia control”, y se diseñan unos cebadores específicos complementarios a dicha secuencia que sean capaces de amplificarlo. En una misma reacción de amplificación se amplifican y se cuantifican simultáneamente dicho gen y la región del gen L1 del VPH, lo que permite establecer una relación entre el número de copias virales y el número de copias de dicho gen en la célula. Así, se obtiene el valor de carga viral de VPH por célula. La secuencia control empleada en el método de la invención para normalizar el valor de carga viral en la célula es, pero sin limitarnos, el gen PSA, ya que este gen no se amplifica en carcinomas, lo que le convierte en un buen candidato para ser usado como control.

ES 2 357 821 A1

Otro aspecto de la invención se refiere a los cebadores SEO ID NO: 1 y SEO ID NO: 2, de ahora en adelante “cebadores de la invención”. Estos cebadores están degenerados, por lo que son capaces de amplificar un fragmento del gen L1 de varios genotipos del VPH.

5 La fusión de una familia de cebadores conocida para la amplificación de la región conservada del gen L1 del VPH, llamada SPF, ha llevado a la obtención de tan solo un par de cebadores degenerados capaces de amplificar esta región en varios genotipos del virus con eficiencias similares, lo que permite la estandarización del método de la invención. Además, cuando se diseñan cebadores es necesario hacer una serie de predicciones, como la temperatura de fusión (T_m), la presencia de pares indeseables (a) o la posibilidad de formación de horquillas (b) que puedan reducir, por
10 competencia, la efectividad de emparejamiento con la secuencia de ADN diana. Así pues, los cebadores que amplifican la región del gen L1 de varios genotipos del VPH son los que se recogen en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2.

Estos cebadores pueden utilizarse para detectar la presencia de VPH y cuantificar la carga viral en muestras biológicas aisladas mediante su uso en una reacción adecuada, como se ha explicado anteriormente.

15 Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso de los cebadores de la invención para amplificar varios genotipos del VPH. En una realización preferida, los genotipos del VPH se seleccionan de la lista que comprende: 16, 31, 33, 52 ó 58.

20 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de los cebadores de la invención para la cuantificación de la carga viral de un genotipo de VPH. En una realización preferida, el genotipo del VPH se selecciona de la lista que comprende: 16,31, 33, 52 ó 58.

25 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de los cebadores de la invención para detectar al menos dos genotipos de VPH en muestras coinfectadas. En una realización preferida, los genotipos del VPH se seleccionan de la lista que comprende: 16,31, 33, 52 ó 58.

30 Existen más de 120 tipos de VPH descritos, divididos entre grupo de alto riesgo y de bajo riesgo. Los cebadores empleados en la presente invención permiten, pero sin limitarnos, la amplificación de varios genotipos virales incluidos dentro del grupo de VPH de alto riesgo: VPH 16, 31, 33, 52 ó 58, los cuales son los de mayor incidencia en la población, como se muestra en los ejemplos.

La región del gen L1 amplificada por los cebadores de la invención, se encuentra altamente conservada entre los distintos genotipos de VPH.

35 Además, dichos cebadores amplifican esta región con eficiencias similares entre las cepas del virus, por lo que aunque en la invención se ejemplifique la amplificación con los cinco tipos de VPH mencionados anteriormente, no pretende ser limitativo, ya que es posible que también permita amplificar y, por tanto, cuantificar otras variantes del virus.

40 Además, mediante el uso de los cebadores de la invención en una reacción de amplificación, preferiblemente, Q-PCR con un fluorocromo, preferiblemente SYBR Green, se puede detectar la presencia de diferentes genotipos de VPH en una misma muestra coinfectada, gracias a las curvas de melting que se obtienen al medir la fluorescencia de la reacción, aunque no así cuantificar la cantidad viral de cada genotipo en la muestra, debido a la superposición de dichas curvas, como se demuestra en los ejemplos de la presente invención. Por ello, la invención se refiere al
45 uso de los cebadores de la invención para amplificar, y por tanto, detectar varios genotipos de VPH en una muestra coinfectada pero sólo se refiere a su uso en la cuantificación viral cuando la muestra está infectada por un sólo genotipo, independientemente del genotipo que sea.

50 En la presente descripción se entiende por “coinfección” la infección de una muestra biológica por al menos dos genotipos virales distintos.

Un último aspecto de la invención se refiere a un kit de detección y cuantificación de la carga viral del VPH, de ahora en adelante “kit de la invención”, que comprende los cebadores de la invención.

55 Dicho kit puede comprender cebadores, sondas y todos aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo el método de la invención. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización.

60 Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención. A título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, el kit contendrá todos los elementos necesarios para la detección y cuantificación de la carga viral del VPH en muestras aisladas, por la técnica que se ha descrito anteriormente.

65 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. *Curvas de Melting de diferentes genotipos del virus del papiloma humano (VPH) amplificadas con los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y control.* A) HPV16, B) HPV31 + negativo, C) HPV58, D) PSA, E) 5 coinfección con 33/58. El término “Threshold” se refiere al “nivel de corte”.

Ejemplos

10 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto efectividad del método de detección y cuantificación de la carga viral del VPH, así como de los cebadores degenerados de la invención. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limita-
15 limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

20 *Diseño de los cebadores degenerados*

Los cebadores recogidos en las SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 se diseñan a partir de las secuencias de los cebadores SPF previamente descritos por Kleter (Bernhard Kleter *et al.*, 1998, *American Journal of Pathology*, Vol. 153, No. 6: 1731-1739). En concreto, se lleva a cabo una fusión de los cebadores SPF1A-D para diseñar el cebador 25 SEQ ID NO: 1 y una fusión de SPF2B y SPF2D para diseñar el cebador SEQ ID NO: 2.

Para estudiar si estos cebadores son capaces de amplificar a una temperatura consenso, se utiliza una muestra de líquido urológico obtenido de la vejiga de un paciente macho infectado con VPH-31. Se usa para ello un Robocycler equipado con un gradiente de temperatura para determinar una temperatura de melting (T_m) óptima, la cual ha
30 resultado ser de 46°C. A esta temperatura la amplificación ofrece una banda visible del tamaño esperado para el gen PSA, amplificado por sus cebadores específicos, y una banda de 60 pares de bases resultante de la amplificación con los cebadores degenerados, que se visualiza con una lámpara ultravioleta en un gel de agarosa al 2%. Este fragmento de 60 pares de bases amplificado mediante los cebadores de la invención comprende tanto la región de 22 pares de bases del gen L1 que se encuentra entre los cebadores una vez que éstos hibridan con la secuencia diana, como las 35 secuencias de estos cebadores.

Ejemplo 2

40 *Método de detección y cuantificación de la carga viral del VPH*

Origen de las muestras

En primer lugar, se determinan los genotipos virales de un conjunto de muestras procedentes de una lesión intraepitelial escamosa de alto y de bajo grado del cuello del útero embebidas en parafina, de carcinoma invasivo y de epitelio normal benigno. Esta determinación genotípica no es necesaria en el método de la invención, pero en el presente ejemplo se realiza para poder determinar de qué genotipos concretos se dispone en las muestras, lo cual no pretende ser limitativo de los genotipos que los cebadores de la invención son capaces de amplificar, y qué incidencia tiene cada uno de ellos en la población.
50

Posteriormente, se toma una alícuota del ADN utilizado en el genotipado viral para determinar la carga viral de las muestras con lesión intraepitelial escamosa de alto grado del cuello del útero.

55 *Cuantificación de la carga viral*

Se lleva a cabo la PCR cuantitativa o Q-PCR en reacciones con un volumen final de 15 μ l, que contienen 7,5 μ l de SYBR Green mix (Takara), 3 μ l (100 ng) de ADN extraído del tejido en parafina y 20 pmoles de los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Dichas reacciones se realizan en la máquina de PCR cuantitativa Retorgene de Corbett. Las condiciones de la Q-PCR son: 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 5 segundos), anillamiento (46°C, 30 segundos) y elongación (72°C, 30 segundos). La lectura de la fluorescencia se lleva a cabo en cada ciclo (81°C, 5 segundos).
60

Además de la región de 22 pares de bases del gen L1, se amplifica, en esa misma reacción de amplificación, el gen PSA para su cuantificación. Este gen no se amplifica en carcinoma invasivo, lo que hace que sea útil como control de la cuantificación, para normalizar la carga viral frente al genoma de la célula. También se amplifica ADN de personas no infectadas para ser usado como control negativo del VPH, muestras que sí son positivas para PSA.
65

ES 2 357 821 A1

La cuantificación de la carga viral se lleva a cabo utilizando en cada muestra un fragmento amplificado del gen PSA como control y el correspondiente producto de amplificación del VPH para calcular la diferencia total en la carga viral con respecto al genoma humano. Se obtienen los valores de eficiencia de PCR para cada muestra.

5 Se realiza un algoritmo para cuantificar la cantidad de ADN viral con respecto a la cantidad de PSA (N), utilizando una ecuación modificada de una previamente descrita en el programa REST. Se determina la diferencia entre los valores de VPH y PSA utilizando la siguiente ecuación:

$$N = (\text{eficiencia de PCR})^{(\text{valor VPH} - \text{valor PSA})}$$

10

El análisis estadístico de la eficiencia de PCR se lleva a cabo con el programa R (<http://cran.r-project.org/>).

15 Para poder cuantificar directamente los fragmentos obtenidos en la PCR cuantitativa se requiere un pico de fluorescencia que pueda ser medido por un software de PCR. De acuerdo con esto, la amplificación de muestras que contienen VPH 16, 31, 33, 52 y 58 producen señales claras y distinguibles que pueden ser fácilmente analizadas por el software interno, al igual que ocurre con los fragmentos obtenidos del gen PSA (véase figura 1 A-D). Esto demuestra que la amplificación utilizando cócteles SYBR Green y los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 pueden usarse para cuantificar directamente carga viral en las muestras.

20

Los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 amplifican un fragmento de 22 pares de bases del gen L1, y aunque esta región muestra polimorfismos moleculares, la eficiencia de amplificación no es significativamente distinta entre los genotipos de VPH estudiados, como muestra un test Kruskal-Wallis $p=0,686$, lo que permite el empleo de este par de cebadores degenerados para detectar y cuantificar diferentes variantes del virus.

25

Como se ha explicado anteriormente, el número de copias virales por célula se calcula en función de la normalización, es decir, del número de copias por célula de la secuencia control, en este caso del gen PSA. En los pacientes en los que se observa una remisión de la lesión inicial, los valores de carga viral detectados se encuentran próximos a las 0,001 copias/célula. De esta manera, el rango de copias virales detectadas mediante el método de la invención en las muestras analizadas es de entre 0,001 y 100 copias virales/célula, lo cual no pretende ser limitativo del rango de copias virales que el método es capaz de detectar. A modo ilustrativo, algunos de los valores de carga viral por célula obtenidos tras la cuantificación son los que se muestran en la tabla 1.

30

35 Ejemplo 3

Método de detección de VPH en muestras coinfectadas

Algunas de las muestras analizadas presentan coinfección con combinaciones de algunos genotipos de VPH, como VPH 16/58, 16/39, 31/58, 52/58 y 33/58. En estos casos, se observan dos picos y un valle que se encuentran muy cercanos entre sí (véase figura 1 E). Así, el método de la presente invención permite la co-amplificación de al menos dos genotipos virales diferentes en muestras con infecciones múltiples, pero no la cuantificación de la carga viral absoluta de cada uno de los genotipos de la muestra coinfectada debido a la superposición de las curvas de melting de cada uno de ellos.

45

Ejemplo 4

Análisis de la incidencia de los distintos genotipos de VPH

50

Los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 se ensayan en 33 muestras que han sido genotipadas previamente. Esto muestra que existe una mayoría de casos de VPH 16 (57%), seguido de VPH 58 (21%) y de unos pequeños porcentajes de VPH 33 (12%), 31 (6%) y 52 (3%), como se muestra en la tabla 1. La carga viral varía entre cinco y treinta copias de VPH por copia de genoma humano en las muestras analizadas.

55

60

65

ES 2 357 821 A1

TABLA 1

Carga viral obtenida en 33 muestras con los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. La carga viral se calcula en relación al gen PSA asumiendo dos copias de PSA por célula

Genotipo viral (donde n es el número de individuos)	Carga viral por célula
HPV-16 (n:19)	9.92 ± 10.8
HPV-31 (n:2)	13.9
HPV-33 (n:4)	9.7 ± 5.0
HPV-52 (n:1)	9.1
HPV-58 (n:7)	5.1 ± 1.2

REIVINDICACIONES

1. Método de detección y cuantificación de la carga viral del VPH, que comprende:

- a. la extracción de ADN de una muestra biológica aislada,
- b. poner en contacto la muestra del paso (a) con una mezcla de reacción que contiene al menos un fluorocromo y los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2,
- c. amplificar un fragmento del gen L1 del VPH,
- d. medir la fluorescencia obtenida en la amplificación del paso (c), y
- e. comparar el valor de fluorescencia obtenido en el paso (d) con una secuencia control.

2. Método de detección y cuantificación de la carga viral del VPH según la reivindicación 1, donde la muestra biológica aislada del paso (a) es una muestra humana procedente del cuello del útero.

3. Método de detección y cuantificación de la carga viral del VPH según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde el fluorocromo del paso (b) es SYBR Green.

4. Método de detección y cuantificación de la carga viral del VPH según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la amplificación del paso (c) se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Q-PCR).

5. Método de detección y cuantificación de la carga viral del VPH según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la secuencia control del paso (e) es el gen PSA.

6. Los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

7. Uso de los cebadores según la reivindicación 6 para amplificar varios genotipos del VPH.

8. Uso de los cebadores según la reivindicación 6 para la cuantificación de la carga viral de un genotipo de VPH.

9. Uso de los cebadores según la reivindicación 6 para detectar al menos dos genotipos de VPH en muestras coinfectadas.

10. Uso de los cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde los genotipos del VPH se seleccionan de la lista que comprende: 16, 31, 33, 52 ó 58.

11. Kit de detección y cuantificación de la carga viral del VPH, que comprende los cebadores según la reivindicación 6.

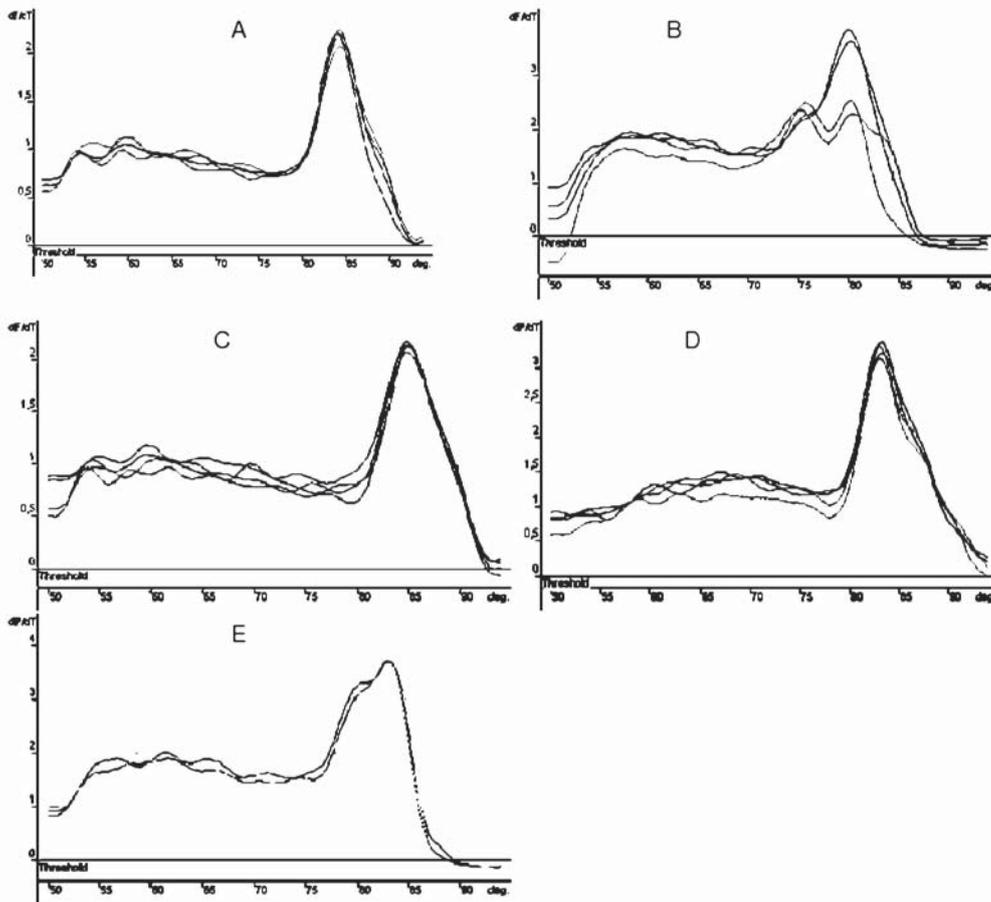


FIG. 1

ES 2 357 821 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Politécnica de Cartagena
Fundación para la Formación e Investigación Sanitaria
5

<120> MÉTODO PARA LA DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL DEL VIRUS DEL PAPILO-
MA HUMANO

10 <130> 1687.2

<160> 2

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 20

20 <212> DNA
<213> Human papillomavirus type 39

<220>
25 <221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n is a, c, g, or t

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
35 <223> r is g or a

<220>
<221> misc_feature
40 <222> (9)..(9)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
45 <221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> y is t or c

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
55 <223> y is t or c

<400> 1

60 gncarggnc ayaayaatgg 20

<210> 2
<211> 23

65 <212> DNA
<213> Human papillomavirus type 39

ES 2 357 821 A1

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

5 <223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (9)..(9)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> w is a or t

20 <400> 2

gtngtatcna cwacagtaac aaa

23

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930425

②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.07.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 1999014377 A2 (INNOGENETICS N. V. & DELFTS DIAGNOSTIC LABORATORY B. V.) 25.03.1999, todo el documento.	1-11
X	KLETER, B., VAN DOORN, L.-J., TER SCHEGGET, J. et al. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. American Journal of Pathology. Diciembre 1998, Vol. 153, Nº 6, páginas 1731-1739. ISSN 0002-9440.	1-8,10,11
Y		9
Y	MELCHERS, W. J. G., BAKKERS, J. M. J. E., WANG, J. et al. Short fragment polymerase chain reaction reverse hybridization line probe assay to detect and genotype a broad spectrum of human papillomavirus types: Clinical evaluation and follow-up. American Journal of Pathology. Noviembre 1999, Vol. 155, Nº 5, páginas 1473-1478. ISSN 0002-9440.	9
A		1-8,10,11
A	RODRIGUES DE ARAUJO, M., DE MARCO, L., SANTOS, C. F. et al. GP5+/6+ SYBR Green methodology for simultaneous screening and quantification of human papillomavirus. Journal of Clinical Virology. Junio 2009, Vol. 45, Nº 2, páginas 90-95. ISSN 1386-6532. <Doi:10.1016/j.jcv.2009.03.020>	1-11
A	SOMOGYVARI, F., DOCZI, I., SERLY, J. et al. Rapid discrimination between <i>Candida albicans</i> and <i>Candida dubliniensis</i> by using real-time polymerase chain reaction. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. Julio 2007, Vol. 58, Nº 3, páginas 367-369. ISSN 0732-8893. <Doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.01.015>	1,3,4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
11.04.2011

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, COMPENDX, INSPEC, XPESP, XPOAC, REGISTRY, HCAPLUS, EMBLall

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.04.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-11	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 1999014377 A2	25.03.1999
D02	KLETER, B. et al. American Journal of Pathology. Diciembre 1998, Vol. 153, Nº 6, páginas 1731-1739.	12.1998
D03	MELCHERS, W. J. G. et al. American Journal of Pathology. Noviembre 1999, Vol. 155, Nº 5, páginas 1473-1478.	11.1999
D04	RODRIGUES DE ARAUJO, M. et al. Journal of Clinical Virology. Junio 2009, Vol. 45, Nº 2, páginas 90-95.	06.2009
D05	SOMOGYVARI, F. et al. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. Julio 2007, Vol. 58, Nº 3, páginas 367-369.	07.2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la presente solicitud, es un método de detección y cuantificación de la carga viral, del virus del papiloma humano (VPH). Éste comprende la amplificación en una muestra humana procedente de cuello de útero, de una región del gen L1, mediante PCR en tiempo real, con los cebadores de secuencias SEQ. ID. NO. 1 y 2, y SYBR Green como fluorocromo (reivindicaciones de la 1 a la 4). El gen PSA se utiliza como secuencia control (reivindicación 5). Además, son objeto de la invención, los cebadores SEQ. ID. NO. 1 y 2 (reivindicación 6), y el kit que comprende dichos cebadores (reivindicación 11). Por último, se incluye el uso de los mismos en: la amplificación de varios genotipos del VPH (reivindicación 7); la cuantificación de la carga viral de un genotipo del VPH (reivindicación 8); y la detección de al menos dos genotipos en muestras coinfectadas (reivindicación 9). Los virus analizados comprenden los genotipos 16, 31, 33, 52 ó 58 (reivindicación 10).

En D01 se optimiza un método de detección y genotipado del VPH, mediante la amplificación por PCR de la misma región de L1 que la solicitud, y posterior hibridación con sondas específicas.

D02, divulga un procedimiento de detección del VPH mediante una PCR que amplifica del nucleótido 6582 al 6601 de L1.

En D03 se desarrolla el método de detección de VPH descrito en D02, demostrando que es posible el genotipado de los virus mediante la hibridación con sondas específicas.

D04 optimiza un procedimiento de detección y cuantificación del VPH mediante PCR cuantitativa, utilizando los cebadores universales GP5+/6+ y SYBR Green. Este método es válido para distintos genotipos del virus, incluso para infecciones múltiples.

En D05 se describe un método de detección y diferenciación de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*, mediante la amplificación con cebadores comunes y estudio de las curvas de "melting". El fluorocromo elegido es SYBR green.

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)

Las reivindicaciones de la 1 a la 11 cumplen el requisito de novedad (art. 6.1 LP11/1986).

2.ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)**2.1 REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 5**

El objeto de la solicitud, según las reivindicaciones 1 y 4, es un método de detección y cuantificación de la carga viral del VPH, que comprende amplificar mediante PCR en tiempo real, una región de L1 con los cebadores SEQ. ID. NO. 1 y 2, y un fluorocromo. En la reivindicación 2, se especifica que la muestra es una muestra humana de cuello de útero.

Tanto en D01 como en D02, se describe un método de detección en muestras humanas procedentes de cuello de útero, de diversos genotipos del VPH, mediante la amplificación de la región 6582-6646 de L1.

En D01 se seleccionaron diez cebadores, cuatro directos y seis reversos. Los cuatro cebadores directos (secuencias SEQ. ID. NO. 15, 16, 17 y 18) son idénticos al cebador de secuencia SEQ. ID. NO. 1 de la solicitud, salvo por las inosinas en posiciones 3 y 9. A su vez, los cebadores de secuencias SEQ. ID. NO. 19 y 21, tan solo se diferencian de la SEQ. ID. NO. 2 de la solicitud, en las inosinas en posiciones 3 y 9. Cabe destacar, que en D01 se afirma que el uso de los cebadores SEQ. ID. NO 15, 16, 19 y 21, sería suficiente para amplificar la mayoría de los genotipos del virus. Además, se muestra que las regiones amplificadas por estos cebadores, y otros previamente divulgados (MY11/MY09 y GP5/GP6) son solapantes.

Los cebadores diseñados en D02 son iguales a los divulgados con SEQ. ID. NO. 1 y 2 en la solicitud, salvo por la incorporación de inosina en las posiciones 3 y 9, tanto en los cebadores directos como en los reversos.

Es decir, en ambos casos la región amplificada en D01 y D02 es la misma que la de la solicitud. Además, esta zona se solapa con las utilizadas por otros estudios en la detección del VPH.

Las principales diferencias entre D01 o D02 y la solicitud, son los cebadores y la elección de la técnica PCR en tiempo real.

El que los cebadores de D01 o D02 presenten inosina en una posición en donde los cebadores de la solicitud pueden incluir A, C, G o T, no se considera una diferencia relevante. Esto es debido a que en el diseño de cebadores, se utiliza la inosina en las posiciones en los que se quiere que hibriden con una secuencia variable. Por otro lado, la elección de un mayor número de cebadores en D01 tampoco se considera importante.

Además, ya es conocido en el estado de la técnica, la utilización de la PCR en tiempo real en la cuantificación del ADN de interés. Por lo tanto, se considera obvia la elección de este método en el caso de querer cuantificar una muestra, así como las modificaciones necesarias para poner a punto una Q-PCR a partir de una PCR previa, tales como la incorporación de un fluorocromo.

En consecuencia, a la vista de los documentos D01 o D02, las reivindicaciones 1, 2 y 4 no tienen actividad inventiva (art. 8.1 LP).

Por último, el objeto de la reivindicación 3, es el uso de SYBR Green como fluorocromo, y el de la 5, el uso del gen PSA como secuencia control para la cuantificación.

Se entiende que éstas son características técnicas derivadas de la elección de la técnica Q-PCR, y que un experto en la materia consideraría el uso de SYBR Green o de PSA, como opciones a tener en cuenta, a la hora de diseñar este tipo de PCRs.

En consecuencia, las reivindicaciones 3 y 5, tampoco presentan actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)

2.2 REIVINDICACIONES 6, 7, 8, 10 Y 11

La solicitud, tiene por objeto los cebadores de secuencias SEQ. ID. NO. 1 y 2 (reivindicación 6), así como el kit que comprende estos cebadores (reivindicación 11). Además, la reivindicación 7 tiene por objeto el uso de dichos cebadores en la amplificación de varios genotipos del VPH, y la 8 en la cuantificación de la carga viral. Por último, la reivindicación 10 especifica que los genotipos del VPH se seleccionan de una lista que comprende el 16, 31, 33, 52 ó 58.

Tanto D01 como D02 amplifican y detectan numerosos genotipos de VPH, entre ellos el 16, 31, 33, 52 y 58.

Por consiguiente, teniendo en cuenta que las técnicas divulgadas en D01 y D02 son válidas para distintos genotipos del VPH, y los argumentos expuestos en el punto 2.1, las reivindicaciones 6, 7, 8, 10 y 11, no cumplen el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

2.3. REIVINDICACIÓN 9.

La reivindicación 9, tiene por objeto, el uso de los cebadores de la solicitud, en la detección de al menos, dos genotipos de VPH en muestras coinfectadas.

El método divulgado en D01 permite la diferenciación de distintos genotipos del VPH, incluso en muestras coinfectadas. Esto es gracias al diseño de sondas específicas de genotipo, que hibridan en la región amplificada.

Por otro lado, en D02 se afirma que la región amplificada por sus cebadores, presenta una gran heterogeneidad, por lo que seguramente se podría utilizar en el genotipado de los VPH.

La principal diferencia entre D02 y la solicitud, es la posibilidad de diferenciación de los distintos genotipos virales.

D03 diseña una serie de sondas específicas para cada genotipo de VPH, a partir del estudio de la región amplificada por la PCR descrita en D02.

En consecuencia, un experto en la materia el intentaría desarrollo de una técnica de genotipado (D03) a partir de la región descrita en D02, con una expectativa razonable de éxito.

Por lo tanto, considerando el documento D01 de manera independiente, o D02 junto con D03, la reivindicación 9 no presenta actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).