



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º de publicación: ES 2 048 652

② Número de solicitud: 9201174

⑤ Int. Cl.⁵: C12N 15/10

//C12N 15/38

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **05.06.92**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.94**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.03.94

⑦ Solicitante/es: **Instituto de Salud Carlos III
Sinesio Delgado, 6
Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Tenorio Matanzo, Antonio**

⑦ Agente:

⑤ Título: **Procedimientos de amplificación de genoma para la detección e identificación de secuencias genómicas relacionadas.**

⑦ Resumen:

Procedimientos de amplificación de genoma para la detección e identificación de secuencias genómicas relacionadas. Al menos uno de los iniciadores que intervienen en la detección se diseña como mezcla simple de oligonucleótidos que contienen secuencias homólogas seleccionadas de entre las secuencias genómicas relacionadas que se quieren amplificar, y que pueden contener secuencias no homólogas y/o alteraciones respecto a las secuencias conocidas. Al menos una de los iniciadores que intervienen en la reacción de identificación, consecutiva o no a la de detección, se diseña como mezcla simple de oligonucleótidos que terminan en su extremo 3' en una secuencia específica de la secuencia que se quiere identificar, y que pueden contener alteraciones respecto a las secuencias conocidas; los iniciadores están diseñados de manera que los fragmentos específicos amplificados son diferentes entre sí por tamaño u otro marcaje físico o químico. Los nuevos procedimientos son especialmente útiles para la detección y la identificación de agentes infecciosos relacionados en una única reacción múltiple.

DESCRIPCION

Campo de la invención

La invención se refiere a nuevos procedimientos y mezclas utilizados para la detección y la identificación de secuencias genómicas relacionadas, especialmente de agentes infecciosos relacionados, especialmente de virus relacionados. Los nuevos procedimientos y mezclas son especialmente útiles para realizar de manera simple, rápida y económica el diagnóstico de infección por agentes relacionados entre sí, especialmente el diagnóstico de infección por virus relacionados entre sí.

10 **Definiciones**

El término “iniciador”, según aquí se utiliza, define una molécula o mezcla de moléculas que contiene(n) más de tres deoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; puede existir naturalmente, ser un fragmento de un enzima de restricción o ser producido sintéticamente. Cuando está en condiciones adecuadas, es capaz de actuar como punto de iniciación para la síntesis de una hebra de ácido nucléico complementaria a la hebra con la cual es capaz de hibridar.

El término “amplificación de genoma”, según aquí se utiliza, define cualquier procedimiento de amplificación exponencial de genoma que utiliza iniciadores según se han definido.

El término “grado de degeneración”, según aquí se utiliza, define el número de diferentes moléculas presentes en un iniciador.

El término “zona conservada”, según aquí se utiliza, define una zona homóloga en diferentes genomas. La homología es preferiblemente mayor del 50%, más preferiblemente mayor del 70% y más preferiblemente aún, mayor del 90%.

El término “secuencia genómica relacionada”, según aquí se utiliza, define una secuencia genómica que incluye al menos dos zonas conservadas.

Estado de la técnica

Con frecuencia, el laboratorio de diagnóstico se encuentra ante la necesidad de realizar diferentes ensayos para la detección e identificación de organismos relacionados, especialmente de agentes infecciosos. En este sentido, son frecuentes los síndromes que pueden ser causados por agentes infecciosos diferentes, pero generalmente relacionados entre sí. Mononucleosis infecciosa en la infancia, meningitis, meningoencefalitis y encefalitis en población adulta y neumonitis, hepatitis, esofagitis o nefritis en enfermos con inmunodepresión celular son algunos ejemplos de síndromes que pueden ser debidos a diferentes miembros de la familia herpesviridae. El síndrome de inmunodeficiencia adquirida, por otra parte, es otro ejemplo de síndrome producido por diferentes miembros de la familia retroviridae.

Existen métodos ya descritos que permiten la detección de agentes infecciosos relacionados entre sí. La hibridación con sondas en zonas relativamente conservadas o el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales para la detección de epítomos comunes son métodos clásicos pero con problemas de sensibilidad y especificidad.

Otros métodos alternativos se han hecho posibles tras la descripción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por Saiki et al. (Science 230, 1350 y Nature 324: 163), por Mullis en la Patente U.S. N° 4.683.195, por Mullis et al. en la Patente U.S. N° 4.683.202 y por CETUS en la Solicitud de Patente Europea 201.184. Las patentes describen procedimientos para detectar la presencia o ausencia de al menos una secuencia específica de ácido nucléico en una muestra que contiene una mezcla de secuencias. Esencialmente, el procedimiento consiste en efectuar un número de amplificaciones cíclicas en las cuales los iniciadores, específicos de la secuencia que se desea amplificar, delimitan los extremos de la secuencia amplificada. Cada uno de los ciclos esencialmente consiste en tres etapas: desnaturalización de la doble hebra del genoma, hibridación de los iniciadores y elongación de la cadena; la repetición del ciclo conduce a una acumulación exponencial del fragmento de genoma delimitado por los iniciadores.

Tomando como metodología básica la PCR, se han descrito diferentes métodos de amplificación de secuencias de organismos relacionados, utilizando iniciadores con un elevado grado de degeneración seleccionados en zonas conservadas entre los organismos relacionados. El método se ha descrito para diferentes familias de virus, entre ellas para herpesviridae por Numberg et al (J. Virol. 63: 3240), para retroviridae por Donehower et al. (J. Virol. Methods, 28: 33) y Shih et al. (J. Virol. 63: 64), para hepadnaviridae

por MacK y Sninsky (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6977) y para papillomaviridae por Ting y Manos (en PCR PROTOCOLS, Academic Press). Aunque los métodos descritos permiten la amplificación de organismos relacionados con una única combinación de iniciadores, el uso de un elevado grado de degeneración conduce generalmente a una escasa sensibilidad de detección, debida a la pequeña proporción de iniciador específico de la secuencia presente en la muestra a amplificar, al tiempo que a una escasa especificidad, mayor cuanto menor sea la longitud de los iniciadores. Con los métodos descritos, la escasa especificidad es en la mayoría de los casos difícil de solucionar, ya que las secuencias conservadas no suelen ser mayores de 4 ó 5 aminoácidos; así, cuando se ensaya el método sobre muestras complejas que contienen genoma de gran tamaño, por ejemplo el humano, los iniciadores son capaces de hibridar inespecíficamente con zonas del genoma similares.

Por otra parte, aunque las patentes anteriores reivindican al menos una secuencia y afirman que pueden amplificarse al mismo tiempo múltiples secuencias, no aportan un procedimiento efectivo para amplificar múltiples secuencias al mismo tiempo. La adición de iniciadores para una segunda secuencia es normalmente posible, pero cuando se añaden iniciadores para más de dos secuencias, el procedimiento falla y produce un gran número de amplificaciones inespecíficas.

Descripción de la invención

La presente invención tiene por objeto describir nuevos procedimientos y mezclas para la detección e identificación de secuencias genómicas relacionadas.

Un aspecto de la invención es un procedimiento de amplificación de genoma para la detección de secuencias genómicas relacionadas en una única mezcla de reacción, caracterizado porque al menos uno de los iniciadores utilizados es en una mezcla caracterizada

- i) por obtenerse como suma simple de oligonucleótidos,
- ii) por incluir, cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 3', secuencias homólogas seleccionadas de entre las secuencias relacionadas que se quieren amplificar,
- iii) por poder incluir además, cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 5', secuencias no homólogas seleccionadas de entre las secuencias relacionadas que se quieren amplificar, y
- iv) porque uno o más de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en la menos un nucleótido.

Otro aspecto de la invención son mezclas como las descritas para el procedimiento anterior.

El uso de las mezclas y el procedimiento previamente descritos mejoran tanto la sensibilidad como la especificidad de la reacción de amplificación de genoma. La mejora en la sensibilidad se logra disminuyendo al máximo el grado de degeneración de iniciadores diseñados en una zona conservada entre diferentes secuencias relacionadas, especialmente en una zona conservada el genoma de agentes infecciosos relacionados. En la técnica anterior, el grado de degeneración era siempre superior al número de diferentes agentes que se podrían amplificar, por lo que la concentración efectiva de cada uno de los iniciadores estaba tanto más disminuida cuanto mayor fuera el grado de degeneración.

Por otra parte, la mejora en la especificidad se logra aumentando, si es necesario, la longitud de los iniciadores mediante la introducción de secuencias correspondientes a zonas no conservadas entre las diferentes secuencias relacionadas que se quieren amplificar. De este modo se evitan los problemas derivados de la amplificación con iniciadores degenerados según la técnica anterior. La escasa longitud que generalmente tienen las zonas conservadas entre secuencias relacionadas no es normalmente suficiente para evitar que los iniciadores diseñados en esas zonas hibriden inespecíficamente con secuencias similares presentes en genomas con elevada complejidad, como el humano. El aumento en la longitud de los iniciadores según la invención disminuye la probabilidad de hibridación inespecífica con secuencias similares presentes en genomas complejos.

Las mezclas y el procedimiento anteriormente descritos son especialmente útiles para la detección, utilizando una única mezcla de reacción, de diferentes secuencias genómicas relacionadas, especialmente para la detección de agentes infecciosos relacionados, más especialmente para la detección de virus relacionados.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento de amplificación de genoma para la detección y la identificación de secuencias genómicas en una única mezcla de reacción caracterizado porque al menos uno de los iniciadores utilizados es una mezcla caracterizada

- 5 i) por obtenerse como suma simple de oligonucleótidos,
- ii) por incluir, cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 3', secuencias específicas de cada una de las secuencias que se quieren tipificar en la reacción de amplificación,
- 10 iii) por estar diseñada de manera que los fragmentos específicos amplificados son diferentes entre sí por tamaño o por diferente marcaje físico o químico de cada uno de los oligonucleótidos componentes de la mezcla, y
- iv) porque uno o más de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en la menos un nucleótido.

15 Otro aspecto de la invención son mezclas como las descritas para el procedimiento anterior.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento de detección e identificación de secuencias genómicas relacionadas en dos reacciones de amplificación consecutivas, caracterizado por

- 20 i) hacerse una primera reacción de amplificación de genoma en la que al menos uno de los iniciadores utilizados es en una mezcla como la utilizada en el primer procedimiento descrito y
- ii) tomando como sustrato el producto de la primera reacción, realizar una segunda reacción de amplificación de genoma en la que al menos uno de los iniciadores utilizados es una mezcla como la utilizada en el segundo procedimiento descrito.

25 El procedimiento anteriormente descrito permite realizar tanto la detección como la identificación de secuencias genómicas relacionadas, especialmente de secuencias correspondientes a agentes infecciosos relacionados, en dos reacciones de amplificación consecutivas.

30 Según la invención, la mezcla compleja de iniciadores utilizada en la segunda reacción no produce las amplificaciones inespecíficas derivadas de su uso en presencia de un genoma complejo. Esto se logra utilizando como genoma sustrato de la reacción un polinucleótido obtenido en la primera reacción de amplificación. La amplificación "multiplex" según la invención tiene como principal ventaja el poder realizar diferentes reacciones de identificación utilizando una única mezcla de reacción, lográndose una importante mejora en la metodología del diagnóstico.

35 Las mezclas y el procedimiento anteriormente descritos son especialmente útiles para la detección y la tipificación de diferentes secuencias genómicas relacionadas, especialmente para la detección de agentes infecciosos relacionados, más especialmente para la detección de virus relacionados.

40 Otro aspecto de la invención son mezclas de oligonucleótidos diseñadas para ser utilizadas como iniciadores de una reacción de amplificación, caracterizadas porque al menos uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla se diferencia de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en al menos un nucleótido.

45 La alteración de la secuencia según la invención, tiene como principal objetivo lograr que las mezclas complejas de iniciadores sean compatibles entre sí; es decir, que no se produzcan hibridaciones entre los diferentes componentes de las mezclas de oligonucleótidos presentes en la mezcla de reacción de amplificación. Las hibridaciones entre oligonucleótidos, frecuentes en mezclas complejas, producen durante la reacción de amplificación secuestro del reactivo necesario y, a menudo, la formación de dímeros de iniciadores.

50 Una realización de la invención es la aplicación de las mezclas y los procedimientos anteriormente descritos a la detección de agentes infecciosos relacionados, especialmente de virus relacionados, más especialmente de virus pertenecientes a la misma familia y aún más especialmente de virus pertenecientes a la familia herpesviridae o de virus pertenecientes a la familia retroviridae, muy especialmente aquéllos capaces de infectar a humanos.

60 Los siguientes Ejemplos y Figuras ilustran, pero no limitan, algunos de los modos de llevar a cabo la invención.

Descripción de las figuras

Figura 1

5 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes a los genes polimerasa de los 6 herpesvirus humanos: herpes simplex tipo 1 (HSV1), herpes simplex tipo 2 (HSV2), virus varicela-zóster (vzv), citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano tipo 6 (HHV6) y virus de Epstein-Barr (EBV). HHVCON representa los aminoácidos conservados entre todos los herpesvirus humanos. Las zonas conservadas homólogas a la ADN-polimerasa a humana (HUMANA) están subrayadas.

10 Figura 2

Alineamiento de aminoácidos de las secuencias relacionadas entre herpesvirus humanos que contienen las secuencias homólogas "YGD⁺TD" y "KK.Y.G". Se representan también las secuencias homólogas a "YGD⁺TD" de la ADN-polimerasa α humana, y de las ADN-polimerasas de levadura, virus vaccinia, adenovirus 2 y los bacteriófagos T4 y Φ 29.

15 Figura 3

Alineamiento de nucleótidos de las hebras codificantes para las secuencias relacionadas entre herpesvirus humanos que contienen las zonas conservadas "YGD⁺TD" y "KK.Y.G".

20 Figura 4

Alineamiento de nucleótidos de las hebras codificantes para las secuencias relacionadas entre herpesvirus humanos que contienen las zonas conservadas "YGD⁺TD" y "KK.Y.G". Con subrayado simple las secuencias relativas a los oligonucleótidos iniciadores seleccionados en el Ejemplo 1. Con doble subrayado las los oligonucleótidos sonda seleccionados en el Ejemplo 4.

25 Figura 5

Alineamiento de nucleótidos de las hebras codificantes para las secuencias relacionadas entre herpesvirus humanos que contienen las zonas conservadas "YGD⁺TD" y "KK.Y.G". Con subrayado simple las secuencias relativas a los oligonucleótidos iniciadores seleccionados en el Ejemplo 1. Entre paréntesis, las secuencias relativas a los oligonucleótidos iniciadores seleccionados en el Ejemplo 6.

30 Figura 6

Alineamiento de aminoácidos de las secuencias relacionadas entre retrovirus humanos que contienen las zonas conservadas "VLPQG" y "QYMDD". HRVCON representa los aminoácidos conservados entre todos los retrovirus humanos.

Figura 7

40 Alineamiento de nucleótidos para las secuencias relacionadas entre retrovirus humanos que contienen las zonas conservadas "VLPQG" y "QYMDD". Las letras en mayúscula son nucleótidos presentes en todos los aislados conocidos, las letras minúsculas son nucleótidos preferentes y el signo de interrogación indica que en ese lugar no hay nucleótido preferente.

Figura 8

45 Alineamiento de nucleótidos para las secuencias relacionadas entre retrovirus humanos que contienen las zonas conservadas "VLPQG" y "QYMDD". Con subrayado simple las secuencias relativas a los oligonucleótidos iniciadores seleccionados en el Ejemplo 2. Con doble subrayado los oligonucleótidos sonda seleccionados en el Ejemplo 5. Las letras en mayúscula son nucleótidos presentes en todos los aislados conocidos, las letras minúsculas son nucleótidos preferentes y el signo de interrogación indica que en ese lugar no hay nucleótido preferente.

Figura 9

55 Alineamiento de nucleótidos para las secuencias relacionadas entre retrovirus humanos que contienen las zonas conservadas "VLPQG" y "QYMDD". Con subrayado simple las secuencias relativas a los oligonucleótidos iniciadores seleccionados en el Ejemplo 2. Entre paréntesis, las secuencias relativas a los oligonucleótidos iniciadores seleccionados en el Ejemplo 7. Las letras en mayúscula son nucleótidos presentes en todos los aislados conocidos, las letras minúsculas son nucleótidos preferentes y el signo de interrogación indica que en ese lugar no hay nucleótido preferente.

60 Figura 10

Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de amplificación generados en el Ejemplo 3. Además del marcador de tamaño (M) que contiene un fragmento de 123 pares de bases (bp) y

sus múltiplos enteros, los fragmentos de 194 bp generados por amplificación de agua (H₂O) como control negativo y de genoma humano en presencia de los herpesvirus HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6 y EBV.

5 Figura 11

1. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de amplificación generados en el Ejemplo 3. Además del marcador de peso molecular (M), que contiene un fragmento de 123 pares de bases (bp) y sus múltiplos enteros, los fragmentos de 194 bp generados por amplificación de agua (H₂O) como control negativo y de genoma humano en presencia de los herpesvirus HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6 y EBV.

2. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de amplificación generados en el Ejemplo 8. Además del marcador de peso molecular, los fragmentos de 156 bp para HSV1 y HSV2, 144 bp para vzv, 131 bp y 199 bp para CMV, 119 bp para HHV6 y 95 bp para EBV.

15

Ejemplos

Ejemplo 1

20 *Diseño de iniciadores para la detección de herpesviridae humanos*

El bloque génico conservado entre los herpesviridae contiene un gen especialmente conservado, el de la ADN-polimerasa, cuya secuencia de aminoácidos se refleja en la Figura 1. Se seleccionan, entre otras posibilidades, la secuencias relacionadas que comprenden las zonas conservadas “YGD₁TD”, conservada incluso para la ADN-polimerasa a humana, y la “KK.Y.G”, sólo presente en herpesviridae. Las secuencias de aminoácidos relacionadas y las secuencias de las hebras codificantes de los herpesvirus humanos correspondientes a las secuencias relacionadas elegidas se reflejan en las Figuras 2 y 3, respectivamente. A partir del análisis de las secuencias relacionadas, se diseñan los siguientes iniciadores, localizados en las zonas con subrayado simple de las Figuras 4 y 5:

30

Detección de Herpesvirus humanos/polaridad positiva:

Mezcla de los siguientes oligonucleótidos, seleccionados en la zona conservada “YGD₁TD”:

35

iniciador HSV 5'-cgc atc ATC TAC GGG GAC ACG GA
 iniciador VZV 5'-aag gtt ATA TAT GGA GAT ACG GA
 iniciador CMV 5'-cgg gtc ATC TAC GGG GAC ACG GA
 iniciador HHV6 5'-gag gta ATT TAT GGT GAT ACG GA
 40 iniciador VZV 5'-cga gtc ATC TAC GGG GAC ACG GA

Los nucleótidos correspondientes a la zona conservada están en mayúsculas y los correspondientes a una zona no conservada están en minúsculas.

45

Detección e identificación de herpesvirus humanos/polaridad negativa:

Mezcla de los siguientes oligonucleótidos, seleccionados en la zona conservada “KK.Y.G”:

50

iniciador HSV 5'-at gac GCC GAT GTA CTT TTT CTT
 iniciador VZV 5'-at tac CCC AAT GTA CTT TTT CTT
 iniciador CMV 5'-ac ttt ACC AAT GTA TCT TTT CTT
 iniciador HHV6 5'-tg tct ACC AAT GTA TCT TTT TTT
 55 iniciador EBV 5'-ag cac CCC CAC ATA TCT CTT CTT

Los nucleótidos correspondientes a la zona conservada están en mayúsculas y los correspondientes a una zona no conservada están en minúsculas.

60

Ejemplo 2

Diseño de iniciadores para la detección de retroviridae humanos

5 En el genoma de los retroviridae existe igualmente un gen especialmente conservado, el de la polimerasa. Se seleccionan las secuencias relacionadas que comprenden las zonas conservadas “VLPQG” y “QYMDD”. Las secuencias de aminoácidos relacionadas y las secuencias de las hebras codificantes de los retrovirus humanos correspondientes a las secuencias relacionadas elegidas se reflejan en las Figuras 3 y 4, respectivamente. A partir del análisis de las secuencias relacionadas, se diseñan los siguientes iniciadores, localizados en las zonas con subrayado simple de las Figuras 8 y 9:

Detección de retrovirus humanos/polaridad positiva:

Mezcla de los siguientes nucleótidos, seleccionados en la zona conservada “VLPQG”:

15
 iniciador HIV1 5'-cag tac aat GTG CTT CCA CAG GG
 iniciador HIV2 5'-ata tat aag GTC TTA CCA CAG GG
 iniciador HTLVI 5'-gca tgg act GTC CTT CCA CAG GG
 20 iniciador HTLVII 5'-gcc tgg aga GTA CTC CCC CAA GG

Los nucleótidos correspondientes a la zona conservada están en mayúsculas y los correspondientes a una zona no conservada están en minúsculas.

25 *Detección de retrovirus humanos/polaridad negativa:*

Mezcla de los siguientes nucleótidos, seleccionados en la zona conservada “QYMDD”:

iniciador HIV1 5'-ac ata caa ATC ATC CAT GTA TTG
 30 iniciador HIV2 5'-at taa gat ATC ATC CAT GTA CTG
 iniciador HTLVI 5'-aa aag tat GTC ATC CAT GTA TTG
 iniciador HTLVII 5'-ag gag aat GTC ATC CAT GTA CTG

Los nucleótidos correspondientes a la zona conservada están en mayúsculas y los correspondientes a una zona no conservada están en minúsculas.

35

Ejemplo 3

Detección de herpesviridae humanos

40 Se preparan muestras conteniendo genoma humano en presencia de herpesvirus. Un método simple de preparación de muestras consiste en el tratamiento durante 45 minutos a 56°C de la suspensión celular en 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 0,5% Tween 20TM, 100 µg/ml proteinasa K; seguido de inactivación de la proteasa por incubación durante 10 minutos a 96°C y posterior enfriamiento de la muestra hasta 4°C.

45

Las muestras se amplifican con 30-40 ciclos de amplificación, con una temperatura de hibridación de los iniciadores que puede elegirse entre los 45 y los 55°C. La temperatura de desnaturalización de la muestra puede estar entre los 92 y los 96°C, preferiblemente 94°C. La temperatura de extensión de la polimerización puede estar entre los 60 y los 80°C, preferiblemente 72°C. Los tiempos de cada ciclo pueden elegirse en el intervalo de 10 segundos a 2 minutos, preferiblemente 20 a 90 segundos, más preferiblemente 30 a 60 segundos y más preferiblemente 30 segundos.

50

La reacción transcurre en una solución de reacción que contiene, además de la muestra, entre 10 nM y 10 µM de cada uno de los componentes de las mezclas de iniciadores, preferiblemente entre 100 nM y 1 µM y más preferiblemente 200 nM. El volumen de reacción puede elegirse entre 5 µl y 500 µl, preferiblemente entre 10 µl y 100 µl y más preferiblemente es de 50 µl.

55

Utilizando los iniciadores diseñados en el Ejemplo 1, se ensayan muestras conteniendo cada uno de los herpesvirus humanos (HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6 y EBV). El análisis de los fragmentos generados se muestra en la Figura 10. Todos los herpesvirus humanos generaron fragmentos de 194 bp.

60

Ejemplo 4

Diseño de sondas para la identificación de herpesviridae humanos

5 Para la identificación de los fragmentos generados en el Ejemplo 3, se diseñan las sondas correspondientes a cada uno de los herpesvirus humanos a partir de las secuencias reflejadas en la Figura 3. Se eligen sondas solapantes, es decir, dirigidas a una zona no conservada entre los diferentes herpesvirus. Como zona se elige la que codifica para los aminoácidos AAGLTAV en HSVJ, GEALVAM en HSV2, VEGIAKI en VZV, PQALVAR en CMV, NQSLRRI en HHV6 y ESETLRG en EBV. Las secuencias de nucleótidos son las siguientes, con doble subrayado en la Figura 4:

15

sonda HSV1	5'-CC GCC GGG CTG ACG GCC GTG
sonda HSV2	5'-GC GAA GCG CTG GTG GCC ATG
sonda VZV	5'-TT GAG GGG ATA GCT AAA ATC
sonda CMV	5'-CG CAG GCT CTG GTG GCG CGT
sonda HHV6	5'-AT CAG TCT CTG CGA AGG ATT
sonda EBV	5'-AG AGC GAG ACC CTG CGC TTT

20 Ejemplo 5

Diseño de sondas para la identificación de retroviridae humanos

25 Para la identificación de los fragmentos generados a partir de los iniciadores diseñados en el Ejemplo 2, se diseñan las sondas correspondientes a cada uno de los retrovirus humanos a partir de las secuencias reflejadas en la Figura 7. Se eligen, como en el Ejemplo anterior, sondas solapantes. Como zona no conservada se elige la que codifica para los aminoácidos QNPDIYIY de HIV1, ANPDVILI de HIV2, MFPTSTIV de HTLVI y AFPQCTIL de HTLV 22. Las secuencias de nucleótidos son las siguientes, con doble subrayado en la Figura 8:

30

sonda HIV1	5'-CAA AAT CCA GAC ATA GTG ATC TAT
sonda HIV2	5'-GCA AAC CCA GAT GTC ATT CTC ATC
sonda HTLVI	5'-ATG TTT CCC ACA TCG ACC ATT GTC
sonda HTLVII	5'-GCC TTC CCC CAA TGC ACT ATT CTT

35 Ejemplo 6

Diseño de iniciadores para la detección e identificación de herpesviridae humanos en los que el marcaje es el peso molecular del fragmento amplificado

40 Para la identificación de los fragmentos generados en el Ejemplo 3, se diseñan los iniciadores para una segunda reacción de amplificación de modo que cada uno de los herpesvirus humanos amplificados genere un fragmento de diferente peso molecular. A partir de las secuencias reflejadas en la Figura 3, se seleccionan inicialmente los siguientes iniciadores de reacción de polaridad positiva:

45

iniciador HSV	5'-TG TGC CGC GGC CTC ACG G
iniciador VZV	5'-ATA GCT AAA ATC GGC GAG AAA ATG GCA CA
iniciador CMV	5'-GGG CCC AGC CTG GCG CAC TA
iniciador HHV6	5'-GCC AAA CAT ATC ACA GAT CG
iniciador EBV	5'-ACC CGG AGC CTG TTT GTG GC

Analizando las posibles interacciones entre los diferentes oligonucleótidos de las mezclas de iniciadores, se observa la siguiente:

55

iniciador HSV	5' - TGTGCCGCGGCCTCACGG	
	GGCACTCCGGCGCCGTGT-5'	iniciador HSV

60 y se decide la introducción de alteraciones en el extremo 5' de la secuencia del iniciador, modificándose así la mezcla de oligonucleótidos diseñada, entre paréntesis en la Figura 5:

Detección e identificación de herpesvirus humanos/polaridad positiva:

5 iniciador HSV 5'-TG TGA AGC GGC CTC ACG G
 iniciador VZV 5'-ATA GCT AAA ATC GGC GAG AAA ATG GCA CA
 iniciador CMV 5'-GGG CCC AGC CTG GCG CAC TA
 iniciador HHV6 5'-GCC AAA CAT ATC ACA GAT CG
 iniciador EBV 5'-ACC CGG AGC CTG TTT GTG GC

10 Aunque en el Ejemplo no se describen iniciadores específicos de HSV1 y HSV2, la invención admite el diseño de dichos iniciadores específicos, que deberían terminar en alguna o algunas de las escasas diferencias que presentan las secuencias de estos virus.

15 Como mezcla de polaridad negativa se decide utilizar la mezcla de detección de polaridad negativa diseñada en el Ejemplo 1:

Detección e identificación de herpesvirus humanos/polaridad negativa:

Mezcla de los siguientes oligonucleótidos, seleccionados en la zona conservada "KK.Y.G":

20 iniciador HSV 5'-AT GAC GCC GAT GTA CTT TTT CTT
 iniciador VZV 5'-AT TAC CCC AAT GTA CTT TTT CTT
 iniciador CMV 5'-AC TTT ACC AAT GTA TCT TTT CTT
 iniciador HHV6 5'-TG TCT ACC AAT GTA TCT TTT TTT
 25 iniciador EBV 5'-AG CAC CCC CAC ATA TCT CTT CTT

La amplificación utilizando las mezclas diseñadas debería generar fragmentos de 156 bp para HSV1 o HSV2, 144 bp para VZV, 131 bp para CMV, 119 bp para HHV6 y 95 bp para EBV.

Ejemplo 7

Diseño de iniciadores para la detección e identificación de retroviridae humanos en los que el marcaje es el peso molecular del fragmento amplificado

35 Para la identificación de los fragmentos generados a partir de los iniciadores diseñados en el Ejemplo 2, se diseñan los iniciadores para una segunda reacción de amplificación de modo que cada uno de los retrovirus humanos amplificados genere un fragmento de diferente peso molecular. A partir de las secuencias reflejadas en la Figura 7, se seleccionan inicialmente los siguientes iniciadores de reacción, de polaridad positiva, todos ellos solapantes con la zona conservada "VLPQG" y entre paréntesis en la Figura 9:

Detección e identificación de retrovirus humanos/polaridad positiva:

45 iniciador HIV1 5'-AAT GTG CTT CCA CAG GGA TGG AA
 iniciador HIV2 5'-AAG GTC TTA CCA CAG GGA TGG AA
 iniciador HTLVI 5'-ACT GTC CTT CCA CAG GGG TTT AA
 iniciador HTLVII 5'-AGA GTA CTA CCC CAA GGG TTT AA

50 Como mezcla de polaridad negativa se diseña la siguiente mezcla de oligonucleótidos, entre paréntesis en la Figura 9:

Detección e identificación de retrovirus humanos/polaridad negativa:

55 iniciador HIV1 5'-ATA GTT ATG TAC CTA CTA AAC ATA
 iniciador HIV2 5'-CGT TTG GGT CTA CAG TAA GAG
 iniciador HTLVI 5'-CGG CAG GAG TTG GGG TAC TCC
 iniciador HTLVII 5'-TAC GTC GAC CGG GTA TAG GA

60 La amplificación utilizando las mezclas diseñadas debería generar fragmentos de 129 bp para HIV1, 95 bp para HIV2, 77 bp para HTLVI y 65 bp para HTLVII.

Ejemplo 8

Detección de herpesviridae humanos e identificación por el peso molecular del fragmento amplificado

5 Utilizando las mezclas de iniciadores de tipificación diseñadas en el Ejemplo anterior, se reamplificaron, en las condiciones definidas en el Ejemplo 3, diluciones 1:1000 de los fragmentos de 194 bp generados en la reacción de detección del Ejemplo 3. Como se refleja en la Figura 10 todos los herpesvirus generaron el fragmento del peso molecular esperado. CMV generó además una segunda banda de peso molecular superior (199bp) debida probablemente a hibridación inespecífica del iniciador de tipificación de EBV en el tercio 5' del fragmento de 194bp de CMV:

15 **CMV 5' -CGGGTCATCTACGGGGACACGGACAGCGTGTTTGTCCGCTTTCGTGGCCTGA**
: :: : : : :

iniciador EBV **5' -ACCCGGAGCCTGTTTGTGGC**

20 **CMV** **CGCCGCAGGCTCTGGTGGCGCGTGGGCCCAGCCTGGCGCACTACGTGACGGC**

CMV **CTGTCTTTTTTGTGGAGCCCGTCAAGCTGGAGTTTGAAAAGGTCTTCGTCTCT**

CMV **CTTATGATGATCTGCAAGAAACGTTACATCGGCAAAGT**

25 De este modo, el uso de dos reacciones de amplificación consecutivas utilizando mezclas de iniciadores según la invención, permite la detección e identificación de cualquiera de los herpesvirus humanos.

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de amplificación de genoma para la detección de secuencias genómicas relacionadas en una única mezcla de reacción, **caracterizado** por que se realizan sucesivos ciclos de reacción en los que se desnaturaliza el genoma presente en la reacción, se hibridan a las hebras de genoma desnaturalizado los iniciadores de la reacción de polimerización de genoma y se realiza una reacción de polimerización de genoma, en que al menos uno de los iniciadores que intervienen en la reacción se obtiene de manera que

i) es una mezcla simple de oligonucleótidos, basándose esencialmente cada uno de dichos oligonucleótidos en secuencias seleccionadas de entre cada una de las secuencias relacionadas que se quieren amplificar,

ii) cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla incluye, preferentemente en su extremo 3', secuencias homólogas seleccionadas de entre las secuencias relacionadas que se quieren amplificar,

iii) cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla puede incluir, preferentemente en su extremo 5', secuencias no homólogas seleccionadas de entre las secuencias relacionadas que se quieren amplificar, y

iv) uno o más de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en la menos un nucleótido.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** además por que posteriormente se identifican las secuencias amplificadas por hibridación o por una reacción de amplificación consecutiva.

3. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** además porque se utilizan para la detección y la identificación de agentes infecciosos relacionados, más especialmente para la detección de virus relacionados y aún más especialmente para la detección de virus capaces de infectar a mamíferos, especialmente a humanos.

4. Un procedimiento de amplificación de genoma para la detección y la identificación de secuencias genómicas en una única mezcla de reacción, **caracterizado** porque se realizan sucesivos ciclos de reacción en los que se desnaturaliza el genoma presente en la reacción, se hibridan a las hebras de genoma desnaturalizado los iniciadores de la reacción de polimerización de genoma y se realiza una reacción de polimerización de genoma, en que al menos uno de los iniciadores que intervienen en la reacción se obtiene de manera que

i) es una mezcla simple de oligonucleótidos, basándose esencialmente cada uno de dichos oligonucleótidos en secuencias seleccionadas de entre cada una de las secuencias que se quieren amplificar,

ii) cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla incluye, preferentemente en su extremo 3', secuencias específicas de cada una de las secuencias que se quieren tipificar en la reacción de amplificación,

iii) los fragmentos específicos amplificados son diferentes entre sí por tamaño o por diferente marcaje físico o químico de cada uno de sus oligonucleótidos componentes, y

iv) uno o más de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en la menos un nucleótido.

5. Un procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** además porque se utiliza para la detección y la identificación de agentes infecciosos relacionados, más especialmente para la detección de virus relacionados y aún más especialmente para la detección de virus capaces de infectar a mamíferos, especialmente a humanos.

6. Un procedimiento de detección e identificación de secuencias genómicas relacionadas en dos reacciones de amplificación consecutivas, **caracterizado** por

i) hacerse una primera reacción de amplificación de genoma según la reivindicación 1 y

ii) tomando como substrato el producto de la primera reacción de amplificación, realizar una segunda reacción de amplificación de genoma según la reivindicación 4.

7. Un procedimiento según la reivindicación 6 **caracterizado** además porque se utiliza para la detección y la identificación de agentes infecciosos relacionados, más especialmente para la detección de virus relacionados y aún más especialmente para la detección de virus capaces de infectar a mamíferos, especialmente a humanos.

5

8. Procedimientos según las reivindicaciones 1 a 7 **caracterizados** además

i) porque las secuencias de los oligonucleótidos componentes de las mezclas se seleccionan de entre las secuencias de los miembros de la familia Retroviridae, especialmente de los genes gag y pol, y

10

ii) porque se utilizan para la detección y la identificación de Retroviridae, especialmente de Retroviridae capaces de infectar a humanos.

9. Procedimientos según las reivindicaciones 1 a 7 **caracterizados** además

15

i) porque las secuencias de los oligonucleótidos componentes de las mezclas se seleccionan de entre las secuencias de los miembros de la familia Herpesviridae, especialmente del bloque conservado que comprende los genes homólogos a los genes UL27, UL28, UL29 y UL30 del virus herpes simplex tipo 1, y

20

ii) porque se utilizan para la detección y la identificación de Herpesviridae, especialmente de herpesviridae capaces de infectar a humanos.

25

30

35

40

45

50

55

60

FIGURA 1-1

HSV1 1 MFSGGGGPLSPGGKSAARAASGFFAPAGPRGASR-GPPPCLRQ
 HSV2 1 MFCAAGGPASPGGKSAARAASGFFAPHNPRGATQTAPPPCRRQ
 VZV 1 MAIRT
 CMV
 HHV6 1 MDSV
 EBV 1 MSGG
 HHVCON

HSV1 NFYNPYLSPVGTQQ-----KPTGPTQRHTYYSEC-----DEFR
 HSV2 NFYNPHLAQTGTQP-----KAPGPAQRHTYYSEC-----DEFR
 VZV GFCNPFLTQASGIKYNPRTGRGNSREFLHSYKTTM-----SSFQ
 CMV 1 MFFNPYLSGGVTGGA-VAGGRRQRSQPGSAQSGKRPPQKQFL
 HHV6 SFFNPYLEANR-L-----KKSRSYI
 EBV LFYNPFLRPNKGLL-----KK-PDKEYL
 HHVCON F NP L

HSV1 FIAPRVLDEDAPPEKRAGVHDGHLKRAPKV-YCGGDERDVLRV
 HSV2 FIAPRSLDEDAPAEQRTGVHDGRLRRAPKV-YCGGDERDVLRV
 VZV FLAPKCLDEDVPMEERKGVHVGTLRPPKV-YCNGKEVPYLDL
 CMV QIVPRGVMFD----GQTGLIKHKTGRLPLMFYREIK--HLLSH
 HHV6 RILPRGIMHD----GAAGLIKDVCDSEPRMFYRDRQ--YLLSK
 EBV RLIPKCD--QTP--GAAGVVDVRGPQPPLCDYQDSLTVVGGDE
 HHVCON P G P Y

HSV1 GSGGFWPRRSRLWGGVDHAPAGFNPTVTVFHVYDILENVEHAY
 HSV2 GPEGFWPRRLRLWGGADHAPEGFDPTVTVFHVYDILEHVEHAY
 VZV RCSSPWPRRVNIWGEIDFRGDKFDPRFNTFHVYDIVETTEAA-
 CMV DMV--WPCP---WRETLVGRV-VGPIR--FHTYD--QTDEAVL
 HHV6 EMT--WPSL-----DIARSKD-YDHMRMKFHIYDAVET--LMF
 EBV DGKGMWWRQRAQEGTARPEADTH-GSPLDFHVYDILETVYTHE
 HHVCON W FH YD

HSV1 GMRAAQFHARFMDAITPTGTVITLLGLT-PEGHRVAVHVYGTR
 HSV2 SMRAAQLHERFMDAITPAGTVITLLGLT-PEGHRVAVHVYGTR
 VZV ---SNGDVS RFATATRPLGTVITLLGMS-RCGKR VAVHVYGIC
 CMV FDSPENVSPRYRQHLPVSGNVLRFFGAT-EHGYSICVNVFGQR
 HHV6 TDSIENLPFQYRHFVTPSGTVIRMFGR-EDGEKICVNVFGQE
 EBV KCAVIP-SDKQG-YVVP CGIVIKLLGRRKADGASVCVNVFGQQ
 HHVCON P G V G G V V G

FIGURA 1-2

HSV1 QYFYMNKEEVDRHLQCRAPRDL CERMAAALRES-----
 HSV2 QYFYMNKAEVDRHLQCRAPRDL CERLAAALRES-----
 VZV QYFYINKAEVDTACGIRSGSELSVLLAECLRSSMITQNDATLN
 CMV SYFYCEYS DTDRLREVIA-----SVGEL-----
 HHV6 QYFYCECVDGRSLKATIN-----NLML-----
 EBV AYFYASAPQGLDVEFAVL-----SALKA-----
 HHVCON YFY

HSV1 -----PGASFRGISADHFEAEVVERTDVYYYETRPALFYRVY
 HSV2 -----PGASFRGISADHFEAEVVERADVYYYETRPALFYRVY
 VZV GDKNAFHGTSFKSASPESFRVEVIERTDVYYYDTQPCAFYRVY
 CMV -----VPEPRTPYAVSVTPATKTSIYGYGTRPVPDLQCV
 HHV6 -----TGEVKMSCSFVIEPADKLSLYGYNANTVVNLFKV
 EBV -----STFDRRTPCRVSVEKVTRRSIMGYGNHAGDYHKIT
 HHVCON Y

HSV1 VRSGRVLSYLCDNF CPA--IKKYEGGVDATTRFILDNPGFVTF
 HSV2 VRSGRALAYLCDNF CPA--IRKYEGGVDATTRFILDNPGFVTF
 VZV SPSSKFTNYLCDNFHPE--LKKYEGRVDATTRFLMDNPGFVCF
 CMV SISNWTMARKIGEYLL EQGFVYEVVDPLTRLVIDR-RITTF
 HHV6 SFGNGYVSQRIGKILQNEGFVVYEIDVDVLRFFVDN-GFLSF
 EBV LSHPN SVCHVATWLQDKHGCRIFEANVDATRRFVLDN-DFVTF
 HHVCON E VD R D F

HSV1 GWYRLKPGRNNTLAQPAAPMAFGTSSDVEFNCTADNLAIEGGM
 HSV2 GWYRLKPGRGNAPAQPRPPTAFGTSSDVEFNCTADNLAVEGAM
 VZV GWYQLKPGVDGERVVRPASRQLT LSDVEIDCMSDNLQAI PND
 CMV GWCSVNR--YDWRQQGRASTC-----DIEVDCDVSDLVAVPDD
 HHV6 GWYNVKK--YIPQDMGKGSNL-----EVEINCHVSDLVSL-ED
 EBV GWYSCRR--AIPRLQHRDSYA-----ELEYDCEVGDLSVRRED
 HHVCON GW E C L

HSV1 SDLPAYKLMCFDIECKAGGEDELAFPVAGHPEDLVIQISCLLY
 HSV2 CDLPAYKLMCFDIECKAGGEDELAFPVAERPEDLVIQISCLLY
 VZV DSWPDYKLLCFDIECKSGGSNELAFP DATHLEDLVIQISCLLY
 CMV SSWPRYRCLSF DIECMG---EGGFPCA EKSDDIVIQISCVCY
 HHV6 VNWPYGCWSFDIECL-G---QNGNFPDAENLGDIVIQISVISF
 EBV SSWPSYQALAFDIECL-G---EEGFPTATNEADLILQISCVLW
 HHVCON P Y FDIEC G FP A D QIS

FIGURA 1-3

HSV1	DLSTTALEHV-----LLFSLGSCDL
HSV2	DLSTTALEHI-----LLFSLGSCDL
VZV	SIPRQSLEHI-----LLFSLGSCDL
CMV	ETGGNTAVDQGI PNGNDGRGCTSEGVIFGHSGHLHLFTIGTCGQ
HHV6	DTEGD-----RDER-----HLFTLGTCEK
EBV	STGEEAG-----RYRR-----ILLTLGTCED
HHVCON	L G C

HSV1	PES-HLNELAARGLPTPVVLEFDSEFEMLLAFMTLVKQYGPEF
HSV2	PES-HLSDLASRGLPAPVVLEFDSEFEMLLAFMTLVKQYGPEF
VZV	PQR-YVQEMKDAGLPEPTVLEFDSEFELLIAFMTLVKQYAPEF
CMV	VGPDV-----DVYEF PSEYELL LGFMLFFQRYAPAF
HHV6	IDGVH-----IYEFASEFELL LGFFIFLRIESPEF
EBV	IEGVE-----VYEF PSELDMLYAFFQLIRDLSVEI
HHVCON	EF SE L F
HUMANA	VEVAATERTLLGFFLAKVHKIDPDI
	IV

HSV1	VTGYNIINFDWPFLLAKLTDIYKVPLDGYGRMNGRGVFRVWDI
HSV2	VTGYNIINFDWPFVLTKLTEIYKVPLDGYGRMNGRGVFRVWDI
VZV	ATGYNIVNFDWAFIMEKLSIYSLKLDGYGSINRGGFLFKIWDV
CMV	VTGYNINSFDLKYILTRLEYLYKVDSQRFCCLPTAQQ-----
HHV6	ITGYNINNFDLKYLCIRMDKIYHYDIGCFSKLNKNGKI-----
EBV	VTGYNVANFDWPYILDRARHIYSINPASLGKIRAGGVCEVRR-
HHVCON	TGYN FD Y
HUMANA	VTGHNIYGFELEVLLQR

HSV1	GQS-----HF-QKR-----SKIKVNGM
HSV2	GQS-----HF-QKR-----SKIKVNGM
VZV	GKS-----GF-QRR-----SKVKINGL
CMV	GRFFLHSPAV-GF--KRQYAAAFPSASHNPASTAATKVYIAGS
HHV6	GISVPHEQYRKGFLQ-----AQTKVFTSGV
EBV	----PHD-AGKGFL--R-----ANTKVRITGL
HHVCON	F K G

HSV1	VNIDMYGIITDKIKLSSYKLNVAEAVLKDKKKDLSYRDIPAY
HSV2	VNIDMYGIITDKVKLSSYKLNVAEAVLKDKKKDLSYRDIPAY
VZV	ISLDMYAIATEKLLSSYKLDVAREALNESKRDLPYKDIPGY
CMV	VVIDMYPVCMAKTNSPNYKLNMAELYLRQRKDDLSYKDIPRC
HHV6	LYLDMYPVYSSKITAQNYKLDTIKICLGQEKEQLSYKEIPKK
EBV	IPIDMYAVCRDKLSLSYKLDTVARKLLGAKKEDVHYKEIPRL
HHVCON	DMY K YKL A L K Y IP

FIGURA 1-4

HSV1	YAAGPAQRGVIGEYCIQDSSLVGLFFKFLPHLELSAVARLAG
HSV2	YASGPAQRGVIGEYCVQDSSLVGLFFKFLPHLELSAVARLAG
VZV	YASGPNTRGIIGEYCIQDSALVGKLFKYLPHLELSAVARLAR
CMV	FVANAEGRAQVGRYCLQDAVLVRDLFNTINFHYEAGAIARLAK
HHV6	FISGPSGRAVVGKYCLQDSVLVRLFKQINYHFEVAEVARLAH
EBV	FAAGPEGRRRLGMYCVQDSALVMDLLNHFVIHVEVAEIAKIAH
HHVCON	R G YC QD LV L H E A A

HSV1	APKRPAAREDEERPEEEGEDEDEREEG----GGEREPEGARE
HSV2	INITRTIYDQQIRVFTCLLRLAGQKGFILPDTQGRFRGLDKE
VZV	ITLTKAIYDQQVRIYTCLLGLASSRGFILDGGYPATFEYKD
CMV	IPLRRVIFDQQIRIYTSLLDECACRDFILPNHYSKGTTPPET
HHV6	VTARCVVFEQQKKIFPCILTEAKRRNMILPSMVSSHNRQ---
EBV	IPCRRVLDDGQQIRVFSCLLAAAQKENFILMPSASDRD----
HHVCON	GQQ L ILP

HSV1	INITRTIYDQQIRVFTCLLRLADQKGFILPDTQGRFRGAGGE
HSV2	APKRPAVPRGEGERP GDNGDEDKDDDEDGDEDGDEREEVARE
VZV	VIPDVGDV-----EEM-DEDE-----
CMV	NSVAVSPNAAIISTAAVPGDAGSVAAMFQMSPPLOAPSSQDG
HHV6	-----
EBV	-----
HHVCON	

HSV1	TA-----GRHVG Y
HSV2	TG-----GRHVG Y
VZV	-----SVSP-T-GT-SS-----GRNVG Y
CMV	VSPGSGSNSSSSVGVFSVSGSGSSGGVGSNDNHGAGGTAAVSY
HHV6	-----GIG Y
EBV	-----GY
HHVCON	Y
HUMANA	AY

HSV1	QGARVLDPTSGFHVNPVVVDFASLYPSIIQAHNLCFSTLSLR
HSV2	QGARVLDPTSGFHVDPVVVDFASLYPSIIQAHNLCFSTLSLR
VZV	KGARVFDPTGFYIDPVVLDFAVSLYPSIIQAHNLCFTTLTLN
CMV	QGATVFEPEVGYNDPVAVVDFASLYPSIIMAHNLCYSTLLVP
HHV6	KGATVLEPKTGYAVPTVVVDFQSLYPSIMAHNLCYSTLVL-
EBV	QGATVIQPLSGFYNSPVLVDFASLYPSIIQAHNLCYSTMITP
HHVCON	GA V P G P V DF SLYPSI AHNLC T
HUMANA	AGGLVLDPKVGFYDKFILLDFNSLYPSIIQEFNICFTT
	II

FIGURA 1-5

HSV1	ADAVAHLEA--GKDYLEIEVGGRRLLFFVKAHVRESLLSILLRD
HSV2	PEAVAHLEAD--RDYLEIEVGGRRLLFFVKAHVRESLLSILLRD
VZV	FETVKRLNPS---DYATFTVGGKRLFFVRSNVRESLLGVLLKD
CMV	GGEYPVDPAD---VYSVTLENGVTHRFVVRASVRVSVLSELLNK
HHV6	-DERQIAGLSESDILTVKLGDE-THRFVKPCIRESVLGSLLKD
EBV	GEEHRLAGLRPGEDYESFRLTGGVYHFVKKHVHESFLASLLTS
HHVCON	FV S L LL
HUMANA	GLSTPARRK
	_____VI_____

HSV1	WLAMRKQIRSRIPOSS-PEEAVLLDKQQAAIKVVCNSVYGFTG
HSV2	WLAMRKQIRSRIPOSP-PEEAVLLDKQQAAIKVVCNSVYGFTG
VZV	WLAMRKAIRARIPGSS-SDEAVLLDKQQAAIKVVCNSVYGFTG
CMV	WVSORRAVRECMRECQDPVRRMLLDKEQMALKVTCNAFYGFTG
HHV6	WLAKRREVKAEMQNCSDPMMKLLLDKKQLALKTTCSNVYGVGTG
EBV	WLAKRKAIKKLLAACEDPRQRTILDKQQLAIKCTCNAVYGVGTG
HHVCON	W R LDK Q A K CN YG TG
HUMANA	LVEDLLEVGT DIRQKALKLTANSMYGCLG
	_____III_____

HSV1	VQHGLLPCLHVAATVTTIGREMLLATREYVHARWAAFEQLLAD
HSV2	VQHGLLPCLHVAATVTTIGREMLLATRAYVHARWAEFDQLLAD
VZV	VAQGFLPCLYVAATVTTIGRQMLLSTRDYIHNNWAAFERFITA
CMV	VVNGMMPCLPIAASITRIGRDMLERTARFIKDNFSEPCFLHNF
HHV6	AAHGLLPCVAIAASVTCLGREMLCSTVDYVNSKMQSE---QF
EBV	VANGLFPCLSLAETVTLQGRMTLERAKAFVEALSPANLQALAP
HHVCON	G PC A T GR ML
HUMANA	FSYSRFYAKPLAALVTVYKGREIL

HSV1	FPEAADMRAPGP-----YSMRIIY
HSV2	FPEAAGMRAPGP-----YSMRIIY
VZV	FPDISSVLSQKA-----YEVKVIY
CMV	FNQEDYVVGTREGDSEESSALPEGLETSSGGSNERRVEARVIY
HHV6	FC-EEFGL-----TSSDFTGD--LEVEVIY
EBV	SPDAWAPLNPE-----GQLRVIY
HHVCON	IY
HUMANA	VIY

HSV1	GDTDSIFVLCRGLTAAGLTAVGDKMASHISRALFLPPIKLECE
HSV2	GDTDSIFVLCRGLTGEALVAMGDKMASHISRALFLPPIKLECE
VZV	GDTDSVFIKFKGVSVEGIAKIGEKMAHIISTALFCPPIKLECE
CMV	GDTDSVFVFRFRGLTPQALVARGPSLAHVVTACLFEVPEVKLEFE
HHV6	GDTDSIFMSVRNMVNSLRRIAPMIAKHITDRLFKSPIKLEFE
EBV	GDTDSLFIIECRGFSESETLRFADALAAHTTRSLFCAPISLEAE
HHVCON	GDTDS F A S LF P LE E
HUMANA	GDTDS
	_____I_____

FIGURA 1-6

HSV1	KTFTKLLLI AKKKYIGVIYGGKML- IKGVDLVRKNNCAFINRT
HSV2	KTFTKLLLI AKKKYIGVICGGKML- IKGVDLVRKNNCAFINRT
VZV	KTFIKLLLI TKKKYIGVIYGGKVL- MKGVDLVRKNNCQFINDY
CMV	KV FVSLMMICKKRYIGKVEGASGLSMKGVDLVRKTACEFVKGV
HHV6	KILCPLILICKKRYIGR- QDDSLLIFKGVDLVRKTSCDFVKGV
EBV	KTF SCLMLITKKRYVGLTDGKTL- MKGVELVRKTACKFVQTR
HHVCON	K L I K K Y G L KGV LVRK C F
HUMANA	KQE-LKGLDIVRRDWC ----- V
HSV1	SRALVDLLFYDDTVSGAAAALAERPAAEWLARPLPEGLQAFGA
HSV2	SRALVDLLFYDDTVSGAAAALAERPAAEWLARPLPEGLQAFGA
VZV	ARKLVELLLYDDTVSRAAAEASCVSIAEWNRRAMPSGMAGFGR
CMV	TRDVL SLLFEDREVSEAAVRLSRLSLDEVKKYGVPRGFWEILR
HHV6	VKDIVDLLFFDEEVQTAAVEF SHMTQTQLREQGVPVFIHKILR
EBV	CRRVLDLVLADARVKEAASLLSHRPFQESFTQGLPVGFLPCID
HHVCON	L D V AA P G
HSV1	VLVDAHRRITDPERDIQDFVLTAE LSRHPRAYTNKRLAHLTVY
HSV2	VLVDAHRRITDPERDIQDFVLTAE LSRHPRAYTNKRLAHLTVY
VZV	I IADAHRQITSPKLDINKFVMTAE LSRPPSAYINRRLAHLTVY
CMV	RLVQARDDL YLHRVRVEDLVLSVLSKDISLYRQSNLPHIAVI
HHV6	RLCEAREELFQNRADVRLMLSSVLSKEMAAYKQPNLAHLSVI
EBV	IILNQAYTDLREGRVPMGELCFSTELSRKLSAYKSTQMPHLAVY
HHVCON	A LS Y H V
HSV1	YKLMARRAQVPSIKDRIPYVIVAQTREVEETVARLAA-LRELD
HSV2	YKLMARRAQVPSIKDRIPYVIVAQTREVEETVARLAA-LRELD
VZV	YKLVMRQGPINVRERIPYVIVAPTDEVE-ADAKSVALLRG-D
CMV	KRLAARSEELPSVGDRVYVLTAPGCRTAPQGSSDNGDSVTAG
HHV6	RRLAQRKEEIPNVGDRIMYVLIAPSIGN-----
EBV	QKFVERNEELPQIHDRIQYVVFVEPKGGV-----
HHVCON	R P R YV
HSV1	AAAPGDEPAPPAALPSPAKRPRETPSPADPPG-GASKPRKLLV
HSV2	AAAPGDEPAPPAALPSPAKRPRETPSHADPPG-GASKPRKLLV
VZV	-----P-LQNTAGKRC-----GEAK-RKLI I
CMV	VVSRSDAIDGTDDDADGGGVEESNRRGGEPAKKRARKPPSAVC
HHV6	-----KQTH---
EBV	-----KGARKT-----
HHVCON	K

FIGURA 1-7

HSV1	S-ELAEDPAYAIAHGVALNTDYFSHLLGAACVTFKALF-GNN
HSV2	S-ELAEDPGYAIARGVPLNTDYFSHLLGAACVTFKALF-GNN
VZV	S-DLAEDPIHVTSHGLSLNIDYFSHLIGTASVTFKALF-GND
CMV	NYEVAEDPSYVREHGVP IHADKYFEQVLKAVTNVLSPVFPGGE
HHV6	NYELAEDPNYVIEHKIPIHAEKYFDQIIKAVTNAISPIFPKTD
EBV	--EMAEDPAYAERHGVPVAVDHYFDKLLQGAANILQCLF-DNN
HHVCON	AEDP YF F

HSV1	A-KITESLLKRFI--PEVWHPPDDVAARLRTAGFGAVGAG---
HSV2	A-KITESLLKRFI--PETWHPPDDVAARLRAAGFGPAGAG---
VZV	T-KLTERLLKRFI--PETRVVNVKMLNRLQAAGFVCIHAPCWD
CMV	TARKDK-FLH-MVL-PRRLHLEPAFLPYSVKAHECC
HHV6	-IKKEK-LLL-YLL-PMKVYLDETFSAIA----EVM
EBV	S-GAALSVLQNFARPPF
HHVCON	L P

HSV1	-----ATAEE-TRMLHRAFDL-A	1235
HSV2	-----ATAEE-TRMLHRAFDL-A	1240
VZV	NKMNTEAEITEEQSHQIMRRVFCIPKAILHQS	1194
CMV		1242
HHV6		1012
EBV		1015

FIGURA 9

HIV1 ATT AGA TAT CAG TAC (AAT GTG CTt CCa CAG GgA TGG AA)A GGA TCA CCA gCa ATA TTC CAa
 HIV2 AAa aGA TAC AT? TAt (AAg GT? TTA CCa CAG GgA TGG AA)g GgG TCa Cca gCa ATt Ttt CAa
 HTLVI ACC AGA TAT GCA TGG (ACT GTC CTt CCa CAG GGG TTT AA)A AAC AGC CCC ACC CTC TTC GAA
 HTLVII ACT AGA TAC GCC TGG (AGA GTA CTA CCC CAA GGG TTT AA)A AAT AGT CCC ACC CTG TTC GAA
 HRVCON A GA TA T A GT T CC CA GG T AA C C T T A

HIV1 aGT AGc ATG ACA AAA ATC TT a GAG CCT TTT AgA AAA cAA aAT CCA GAC ATa gTt ATC
 HIV2 tac ac? ATG AGa CA? gT? tT a GAa CC? TTC AGa Aaa (GCa AAC cca GAt gTc Att ?T?)
 HTLVI CAA CAA TTA GCA (GCC GTC CT C AAC CCC ATG AGG) AAA ATG TTT CCC ACA TCG ACC ATT
 HTLVII (ATG CAG CTG GCC CAT ATC CT)G CAG CCC ATT CGG CAA GCC TTC CCC CAA TGC ACT ATT
 HRVCON T T A CC T G CC

HIV1 (TAT CAA TAC ATG GAT GAT TTG TAT) GTA GGA TCT
 HIV2 aTc CAg TAc ATG GAT GAT ATc tTa aTa Gct Agt
 HTLVI GTC CAA TAC ATG GAT GAC ATa CTT TTA GCC AGC
 HTLVII CTT CAG TAC ATG GAT GAC ATT CTC CTG GCA AGC
 HRVCON CA TA ATG GAT GA T GC

2 048 652

FIGURA 10

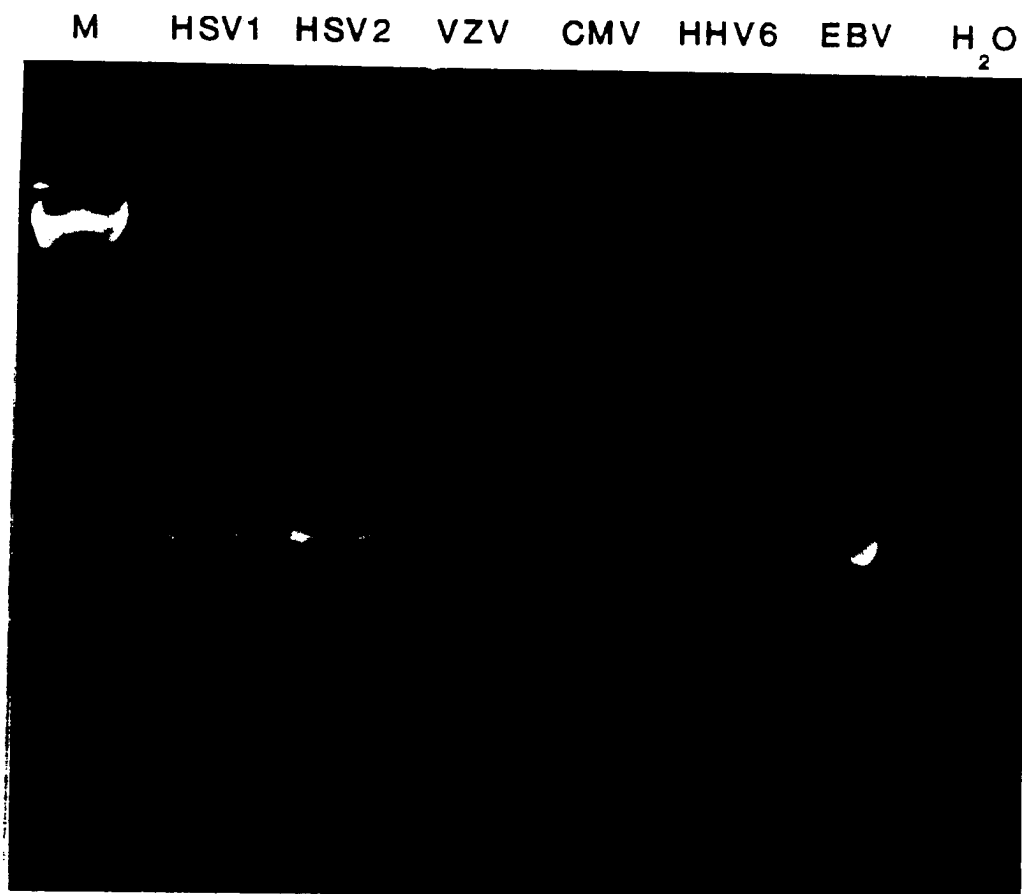
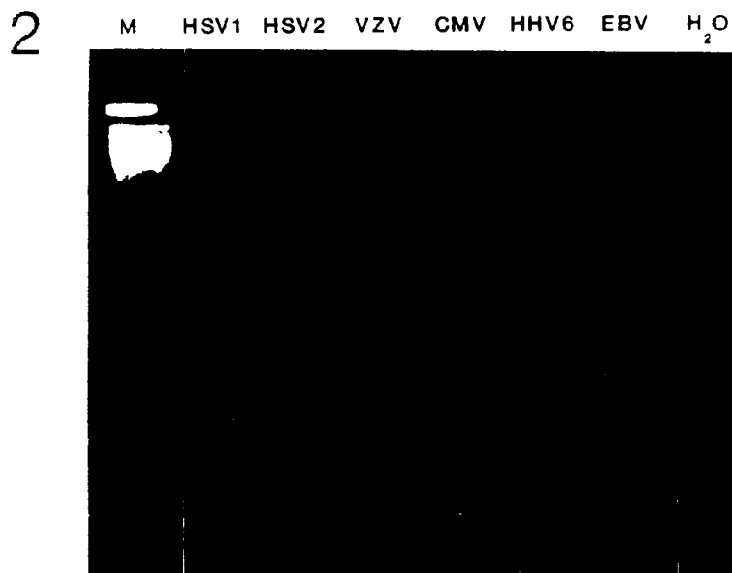
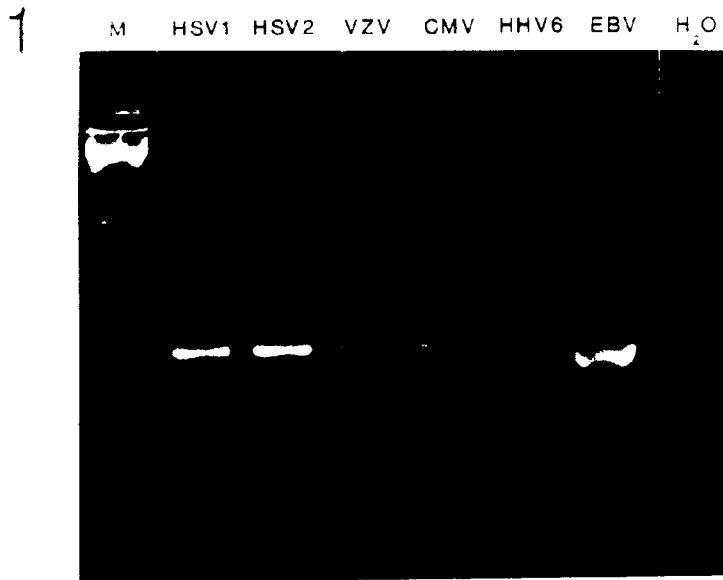


FIGURA 11





INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁵: C12N 15/10 // C12N 15/38

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, Vol. 28 (1990) pp. 59-66. ANCESCHI M.M. et al.: "Multiple primer pairs polymerase chain reaction for the detection of human papillomavirus types". * Pág. 60,62,64 *	1-5,8
A	* Todo el documento *	1-9
Y	SAIKI, R.K. "The Design and optimization of PCR" pp. 7-16. Octubre 1989. ERLICH, H.A. (ed.): "PCR Technology: principles and applications for DNA amplification". STOCKTON PRESS. NEW YORK. USA * Pág. 8-10 *	1-5,8
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Vol. 17 n° 5, 1989 pp. 2142. BARUN et al. "Multiple primer pairs for the detections of HTLV-I by PCR". * Todo el documento *	1-5,8
A	EP-A-469610 (SHIONOGI SEIYAKU KABUSHIKI) * Todo el documento *	6-7

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 n°:

Fecha de realización del informe

14.01.94

Examinador

N. Urquía Fernández

Página

1/1