

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 946 232**

21 Número de solicitud: 202230021

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6888 (2008.01)

C12N 15/50 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

13.01.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.07.2023

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN E
INNOVACIÓN BIOSANITARIA EN EL PRINCIPADO
DE ASTURIAS (100.0%)
Avenida de Roma s/n
33011 Oviedo (Asturias) ES**

72 Inventor/es:

**MELÓN GARCÍA, Santiago;
ALVAREZ ARGÜELLES, Marta Elena;
ROJO ALBA, Susana;
SANDOVAL TORRIENTES, Marta y
BOGA RIVEIRO, José Antonio**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **SISTEMA DE DETECCIÓN DE VARIANTES DE SARS-CoV-2 MEDIANTE RT-qPCR**

57 Resumen:

Sistema de detección de variantes de SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biotecnología, en particular dentro del campo de detección rápida de virus patógenos, más concretamente del virus SARS-CoV-2 y sus variantes. La presente invención se refiere a un kit que comprende un conjunto de sondas y cebadores para la detección de mutaciones en las posiciones 417, 452, 478, 484 y/o 501 de la proteína S del virus. La presente invención también se refiere al uso de estas sondas y cebadores para la detección y/o cuantificación in vitro de variantes de SARS-CoV-2 portadoras de estas mutaciones en muestras biológicas, así como a un método in vitro para la detección de estas variantes.

ES 2 946 232 A1

DESCRIPCIÓN

SISTEMA DE DETECCIÓN DE VARIANTES DE SARS-CoV-2 MEDIANTE RT-qPCR

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biotecnología, en particular dentro del campo de detección rápida de virus patógenos, más concretamente del virus SARS-CoV-2 y sus variantes. La presente invención se refiere a un kit que comprende un conjunto de sondas y cebadores para la detección de mutaciones en las posiciones 417, 452, 478, 484 y/o 501 de la proteína S del virus. La presente invención también se
 10 refiere al uso de estas sondas y cebadores para la detección y/o cuantificación *in vitro* de variantes de SARS-CoV-2 portadoras de estas mutaciones en muestras biológicas, así como a un método *in vitro* para la detección de estas variantes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El coronavirus de tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) pertenecen al género de los beta coronavirus. En particular, el SARS-CoV-2 puede causar infecciones del tracto
 20 respiratorio humano e inflamación pulmonar, conocida como neumonía por nuevo coronavirus (COVID-19). COVID-19 es una nueva enfermedad infecciosa respiratoria aguda, altamente contagiosa en la población. Se transmite principalmente a través de gotitas respiratorias, secreciones y contacto directo.

25 El genoma del SARS-CoV-2 comprende los siguientes marcos de lectura abiertos u ORF, desde su extremo 5' hasta su extremo 3': ORF1a y ORF1ab correspondientes a las proteínas no estructurales que forman el complejo transcripción-replicación, y ORF-S, ORF-E, ORF-M y ORF-N correspondientes a las cuatro proteínas principales, la glicoproteína de pico (S), la proteína de envoltura (E), la glicoproteína de membrana (M)
 30 y la proteína de la nucleocápside (N).

El genoma del ARN del SARS-CoV-2 tiene un casquete metilado en 5' y una cola poliadenilada en 3', lo que permite que el ARN se una al ribosoma de la célula huésped para su traducción. ORF1ab codifica una proteína llamada ARN polimerasa dependiente
 35 de ARN (RdRp o nsp12), que permite que el genoma viral se transcriba en nuevas

copias de ARN utilizando la maquinaria de la célula huésped.

La proteína S se une a receptores específicos en la superficie de la célula diana y entra en ella para replicarse, causando así la infección. Algunos estudios han demostrado que el SARS-CoV-2 usa la proteína S para unirse a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) del receptor humano para invadir las células huésped.

Los coronavirus son virus de ARN monocatenario positivo con envoltura. Los virus de ARN son extremadamente susceptibles a las mutaciones, que pueden estar relacionadas con su propagación y toxicidad. Desde mediados de 2020 han surgido algunas variantes de SARS-CoV-2 que presentan mutaciones en la proteína S y que han tenido un gran impacto en la epidemiología de la enfermedad COVID-19 que actualmente se están extendiendo por todo el mundo. Algunas de estas variantes son la variante Alfa o de Reino Unido (UK) (linaje B.1.1.7; mutaciones notables N501Y, 69-70del y P681H); la variante Beta o de Sudáfrica (SA) (linaje B.1.351; mutaciones notables N501Y, E484K, K417N) y la variante Gamma o de Brasil (BR) (linaje P.1; mutaciones notables N501Y, E484K, K417T).

Todas estas nuevas variantes de SARS-CoV-2 se caracterizan por una mayor transmisibilidad de persona a persona en comparación con variantes anteriores del virus. Las variantes UK, SA y BR comparten la mutación N501Y en la región de unión al receptor (RBD). Se piensa que esta mutación aumenta la afinidad de unión de la proteína S hacia el receptor ACE2 humano (hACE). Las variantes SA y BR comparten una mutación adicional en esta región (K417T / N) que se sospecha contribuye a una mayor afinidad de unión a hACE2.

Se ha visto que la mutación E484K mejora la capacidad del SARS-CoV-2 para escapar de la respuesta inmune, tanto la natural como la inducida por la vacuna. Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales derivados del suero son de 10 a 60 veces menos efectivos para neutralizar el virus que porta la mutación E484K.

En consecuencia, estas variantes emergentes de SARS-CoV-2 son motivo de preocupación debido a su mayor transmisibilidad (Reino Unido, BR y SA). La sensibilidad reducida a los anticuerpos neutralizantes de las variantes que portan la mutación E484K (SA y BR) puede comprometer la eficacia de la vacuna. Además, la

evolución convergente parece indicar que las cepas que albergan N501Y o E484K, o ambas, están evolucionando y extendiéndose rápidamente con un número creciente de mutaciones fuertemente asociadas y coexistentes en diferentes regiones de genes del SARS-CoV-2.

5

Sin duda, el análisis del genoma a través de la tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS) comprende el enfoque más preciso para la caracterización molecular del SARS-CoV-2. Sin embargo, esta técnica es lenta, cara y laboriosa, exigiendo una infraestructura no existente en muchos laboratorios de diagnóstico microbiológico, lo que desde un punto de vista práctico restringe la caracterización a un pequeño número de muestras de pacientes infectados con SARS-CoV-2. También se pueden utilizar métodos alternativos, como los ensayos de detección diagnóstica basados en PCR, para la detección temprana y el cálculo de la prevalencia de las variantes del virus. Dentro de los métodos basados en PCR destaca la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

15

La detección por RT-PCR es el método más utilizado para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2. La especificidad y tolerancia de la detección por RT-PCR dependen principalmente de la especificidad y tolerancia de los cebadores y las secuencias de sonda empleados en la reacción. Las secuencias de cebador y sonda con buena tolerancia deben seleccionarse en una posición altamente conservada en el genoma del SARS-CoV-2 para evitar perder la detección de ciertas cepas del virus del SARS-CoV-2 debido a diferencias en el genoma en esta posición. También se emplea la PCR multiplex que permite la detección de múltiples patógenos en una muestra, lo que puede mejorar la eficiencia de la detección y reducir los costes.

20

25

Por otra parte, se han realizado estudios recientes para tratar de mejorar la detección de mutaciones en la proteína S del virus SARS-CoV-2. Algunos de estos ensayos son los basados en la detección de polimorfismos de nucleótidos único (SNPs), por ejemplo, un ensayo basado en la curva de fusión (*Durner et al. Dent. Mater. 2021; 37: e95–e97*) o un ensayo basado en la sonda TaqMan (*Sandoval Torrientes et al. J Virol Methods. 2021 Aug; 294:114143*), ambos dirigidos a una sola mutación que resulta en la sustitución de aminoácidos en la posición 501. En el estudio de *Serafeim C. et al. J Virol Methods. 2021 Oct; 296:114242* se diseñó un ensayo RT-PCR en tiempo real de un solo paso para la tipificación simultánea, rápida y precisa de mutaciones del gen SARS-CoV-

35

2, asociadas con las sustituciones en las posiciones 484 y 501 de la proteína S (E484K y N501Y). Con este fin, se diseñaron cuatro sondas TaqMan con química de ácido nucleico bloqueado (ANB). Dos de ellas se utilizaron para la diferenciación entre la secuencia de tipo salvaje y la secuencia con la mutación en la posición 484 y las otras dos se utilizaron para el mismo propósito en la posición 501. Se conjugaron diferentes fluoróforos en el extremo 5' de cada sonda Taqman para facilitar la diferenciación de las respectivas señales de fluorescencia.

Las pruebas de detección actuales pueden fallar en la detección de todos los pacientes positivos para COVID-19 y, además, la detección específica de cepas que albergan mutaciones en el gen S solo es válida durante un corto período de tiempo. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar pruebas basadas en PCR que sean robustas y estables en el tiempo para detectar SARS-CoV-2 y que además permitan la tipificación simultánea, rápida y precisa de las mutaciones en la proteína S del virus SARS-CoV-2.

En el estado de la técnica existen divulgaciones relacionadas con diferentes métodos y tecnologías para la detección de distintas variantes del virus SARS-CoV-2.

El documento de patente WO2021176099A1 divulga un método para la detección de la presencia y / o ausencia de SARS-CoV-2 en una muestra basado en el análisis de los genes RdRP (*nsp12*) y *nsp9* del virus SARS-CoV-2 y de algunas de sus variantes. Los genes de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP o *nsp12*) y la proteína de unión a ARN monocatenario (*nsp9*) del virus se encuentran entre las regiones más conservadas. En este documento también se han identificado dos dianas adicionales, en los genes *nsp6* y *N*. La diana en el gen *nsp6* es específica para las variantes del SARS-CoV-2 UK, SA y BR y, por lo tanto, permite la detección de la presencia o ausencia de una variante preocupante del SARS-CoV-2 en una muestra. La diana en el gen *N* es específica para la variante del SARS-CoV-2 del Reino Unido y, por lo tanto, permite la detección de la presencia de la variante SARS-CoV-2 del Reino Unido cuando se usa solo, y la detección de la presencia de la variante SARS-CoV-2 del Reino Unido, SA o BR, cuando se usa en combinación con el gen diana *nsp6*. El método descrito en este documento del estado del arte es una RT-PCR que se basa en la utilización de sondas y cebadores específicos para la detección de la presencia o ausencia de la variante de Reino Unido (B.1 .1 .7), la de Sudáfrica (B.1 .351) y la de Brasil (P.1). Las sondas y cebadores empleados en este documento de patente del estado de la técnica

son distintas a las descritas en la presente invención.

El documento de patente CN111961762A divulga un cebador de RT-PCR fluorescente, una sonda, un reactivo y un método para detectar el coronavirus SARS-CoV-2. El
5 fragmento Orf1ab en el genoma del SARS-CoV-2 se utiliza como diana para llevar a cabo la detección cualitativa del SARS-CoV-2. El reactivo de detección de RT-PCR de fluorescencia de SARS-CoV-2 se prepara mediante una tecnología de liofilización. Por otra parte, CN112063764A divulga una composición de sondas y cebadores de RT-PCR fluorescente en tiempo real múltiple para la detección de ácidos nucleicos de
10 coronavirus. El kit incluye cebadores y sondas de RT-PCR de fluorescencia para detectar el gen *ORF1ab* y el gen *N* del SARS-CoV-2.

El documento de patente CN113249522A divulga un método que permite detectar cepas variantes del virus SARS-CoV-2 mediante PCR. Gracias al método descrito se rompe el
15 cuello de botella técnico existente en la tecnología de PCR de fluorescencia. En la PCR de fluorescencia es complicado realizar una identificación de base única. En este documento del estado del arte se diseñan dos sondas para que puedan detectar el cambio en una sola base G-C. Mediante estas sondas se pueden detectar variaciones en la posición 484 de la proteína S.

20 CN112575120A divulga un método que permite la detección de la mutación D614G en la proteína S del virus SARS-CoV-2. Para ello se diseñan una serie de sondas y cebadores específicos y se emplea el método RT-PCR. Este método tiene las ventajas de que es sencillo, presenta un período de detección corto y tiene una alta sensibilidad.

25 A pesar de que hay una pluralidad de documentos que describen distintas formas de detección del virus SARS-CoV-2, existe una necesidad de nuevos métodos y reactivos para identificar con especificidad y sensibilidad mejorada la presencia y/o ausencia de variantes de SARS-CoV-2 en las muestras, preferentemente de manera simultánea (en
30 una única reacción de amplificación).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a resolver la necesidad de proporcionar métodos
35 basados en PCR que sean robustos y estables en el tiempo para detectar SARS-CoV-

2 y sus variantes, que permitan la tipificación simultánea, rápida y precisa de las distintas mutaciones en la proteína S del virus SARS-CoV-2.

Los autores de la presente invención han desarrollado un conjunto de sondas y
 5 cebadores que permiten una caracterización rápida, sencilla y relativamente barata de mutaciones presentes en las posiciones 417, 452, 478 y/o 484 de la proteína S del virus SARS-CoV-2. En la presente invención también se describe un kit para la detección de estas mutaciones que comprende, al menos, un conjunto de estas sondas y cebadores. En base a estas sondas y cebadores, los inventores también han desarrollado un
 10 método *in vitro* para la detección de las variantes portadoras de estas mutaciones. Estas variantes son la variante Alfa (linaje B.1.1.7), la variante Beta (linaje B.1.351), la variante Gamma (linaje P.1), la variante Kappa (linaje B.1.617.1), la variante Delta (B.1.617.2) y la variante Lambda (linaje C.37).

15 El método descrito en la presente invención permite la detección de variantes portadoras de mutaciones en estas posiciones en apenas una hora. Además, permite analizar todas las muestras de pacientes infectados con SARS-CoV-2 identificadas, mientras que otros métodos como la secuenciación solo permiten el análisis de un pequeño número de muestras.

20 Así un aspecto de la invención se refiere a un conjunto de sondas y cebadores específicos, de ahora en adelante “sondas y cebadores de la invención”, para la detección de mutaciones en las posiciones 417, 452, 478 y/o 484 de la proteína S del virus SARS-CoV-2. El conjunto de sondas y cebadores de la invención es seleccionado
 25 de la lista que consiste en:

- a) Cebador directo que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:1, cebador inverso que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:2, sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:3, sonda que
 30 comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:4, y sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:5;
- b) Cebador directo que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:6, cebador inverso que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:7, sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:8, sonda que
 35 comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:9, y sonda que

comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:10;

c) Cebador directo que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:11, cebador inverso que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:12, sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:13, y sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:14; y

d) Cebador directo que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:15, cebador inverso que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:16, sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:17, sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:18, y sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:19.

En la presente invención se entiende por “detectar” o “detección” a reportar o identificar las secuencias de las variantes del virus SARS-CoV-2 que presentan mutaciones en las posiciones 417, 452, 478 y/o 484 de la proteína S.

El término “cebador” (también denominado “oligo”), se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando hibrida con el ácido nucleico molde. Los cebadores pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, la clonación y restricción de secuencias apropiadas y la síntesis química directa. Los cebadores pueden diseñarse para hibridar con secuencias específicas de nucleótidos en el ácido nucleico molde (cebadores específicos), como en la invención, o pueden ser sintetizados al azar (cebadores arbitrarios).

El término “sonda” se refiere a un fragmento de ADN utilizado para detectar la presencia de un fragmento de ADN específico dentro de una muestra a través de la hibridación con un ADN bicatenario. Las sondas de la invención se pueden producir por los métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, pueden producirse a partir de síntesis química.

Las sondas y cebadores de (a) detectan las mutaciones K417T y K417N, las de (b) detectan las mutaciones L452R y L452Q, las de (c) detectan la mutación T478K y las de (d) detectan las mutaciones E484K y E484Q. Estas mutaciones son polimorfismos de un solo nucleótido o SNP. Los “SNP” se definen como una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G))

de una secuencia del genoma.

La proteína S del virus SARS-CoV-2 es la procedente del aislado Wuhan-Hu-1 [número de referencia en NCBI: YP_009724390.1]. Su secuencia aminoacídica es la definida en
 5 la SEQ ID NO: 24. Su secuencia nucleotídica [número de referencia en NCBI: NC_045512.2] es la definida en la SEQ ID NO: 25.

SEQ ID NO: 24

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPF
 10 FSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSL
 LIVNNATNVVIKVEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQP
 FLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGIN
 ITRFQTLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCA
 LDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVY
 15 AWRNRKRISNCVADYSVLNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV
 QIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFR
 DISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATV
 CGPKKSTNLVKNKCVNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQT
 LEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGS
 20 NVFQTRAGCLIGAHEVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSL
 GAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSF
 CTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFI
 EDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALL
 AGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQD
 25 SLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDR
 LITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFP
 QSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFY
 EPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDIS
 GINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMT
 30 IMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVKGVKLHYT

SEQ ID NO:25

ATGTTTGTCTTTCTTGTCTTTATTGCCACTAGTCTCTAGTCAGTGTGTTAATCTTACAA
 CCAGAACTCAATTACCCCCTGCATACACTAATTCTTTCACACGTGGTGTCTTATTAC
 35 CCTGACAAAGTTTTTCAGATCCTCAGTTTTACATTCAACTCAGGACTTGTTCTTACCT

TTCTTTTCCAATGTTACTTGGTTCATGCTATACATGTCTCTGGGACCAATGGTACT
 AAGAGGTTTGATAACCCTGTCCTACCATTTAATGATGGTGTTTATTTTGCTTCCACT
 GAGAAGTCTAACATAATAAGAGGCTGGATTTTTGGTACTACTTTAGATTCTGAAGAC
 CCAGTCCCTACTTATTGTTAATAACGCTACTAATGTTGTTATTAAAGTCTGTGAATT
 5 TCAATTTTGTAATGATCCATTTTTGGGTGTTTATTACCACAAAAACAACAAAAGTTG
 GATGGAAAGTGAGTTCAGAGTTTATTCTAGTGCGAATAATTGCACTTTTGAATATG
 TCTCTCAGCCTTTTCTTATGGACCTTGAAGGAAAACAGGGTAATTTCAAAAATCTTA
 GGGAATTTGTGTTTAAGAATATTGATGGTTATTTTAAAATATATTCTAAGCACACGC
 CTATTAATTTAGTGCGTGATCTCCCTCAGGGTTTTTCGGCTTTAGAACCATTGGTA
 10 GATTTGCCAATAGGTATTAACATCACTAGGTTTCAAACCTTACTTGCTTTACATAGA
 AGTTATTTGACTCCTGGTGATTCTTCTTCAGGTTGGACAGCTGGTGCTGCAGCTTA
 TTATGTGGGTATCTTCAACCTAGGACTTTTCTATTAAAATATAATGAAAATGGAAC
 CATTACAGATGCTGTAGACTGTGCACTTGACCCTCTCTCAGAAACAAAGTGACGT
 TGAAATCCTTCACTGTAGAAAAAGGAATCTATCAAACCTTCTAACTTTAGAGTCCAAC
 15 CAACAGAATCTATTGTTAGATTTCTAATATTACAACTTGTGCCCTTTTGGTGAAG
 TTTTAAACGCCACCAGATTTGCATCTGTTTATGCTTGGAACAGGAAGAGAATCAGC
 AACTGTGTTGCTGATTATTCTGTCCTATATAATTCCGCATCATTTTCCACTTTTAAG
 TGTTATGGAGTGTCTCCTACTAAATTAAATGATCTCTGCTTTACTAATGTCTATGCA
 GATTCATTTGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGGCAAACCTG
 20 GAAAGATTGCTGATTATAATTATAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAG
 CTTGGAATTCTAACAATCTTGATTCTAAGGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGTATA
 GATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAACTGAAATCT
 ATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAATGGTGTGGAAGGTTTTAATTGTTACTTTCT
 TTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTAATGGTGTGTTGGTTACCAACCATACAGAGT
 25 AGTAGTACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAA
 GTCTACTAATTTGGTTAAAAACAAATGTGTCAATTTCAACTTCAATGGTTTAACAGG
 CACAGGTGTTCTTACTGAGTCTAACAAAAAGTTTCTGCCTTTCCAACAATTTGGCA
 GAGACATTGCTGACACTACTGATGCTGTCCGTGATCCACAGACACTTGAGATTCTT
 GACATTACACCATGTTCTTTTGGTGGTGTGAGTGTTATAACACCAGGAACAAATAC
 30 TTCTAACAGGTTGCTGTTCTTTATCAGGATGTTAACTGCACAGAAGTCCCTGTTG
 CTATTCATGCAGATCAACTTACTCCTACTTGGCGTGTTTATTCTACAGGTTCTAATG
 TTTTCAAACACGTGCAGGCTGTTTAATAGGGGCTGAACATGTCAACAACCTCATAT
 GAGTGTGACATACCCATTGGTGCAGGTATATGCGCTAGTTATCAGACTCAGACTA
 ATTCTCCTCGGCGGGCACGTAGTGTAGCTAGTCAATCCATCATTGCCTACACTAT
 35 GTCACCTGGTGCAGAAAATTCAGTTGCTTACTCTAATAACTCTATTGCCATACCCA

CAAATTTTACTATTAGTGTTACCAACAGAAATTCTACCAGTGTCTATGACCAAGACAT
 CAGTAGATTGTACAATGTACATTTGTGGTGATTCAACTGAATGCAGCAATCTTTTGT
 TGCAATATGGCAGTTTTTGTACACAATTAACCGTGCTTTAACTGGAATAGCTGTT
 GAACAAGACAAAAACACCCAAGAAGTTTTTGCACAAGTCAAACAAATTTACAAAAC
 5 ACCACCAATTAAAGATTTTGGTGGTTTTAATTTTTCACAAATATTACCAGATCCATC
 AAAACCAAGCAAGAGGTCATTTATTGAAGATCTACTTTTCAACAAAGTGACACTTG
 CAGATGCTGGCTTCATCAAACAATATGGTGATTGCCTTGGTGATATTGCTGCTAGA
 GACCTCATTTGTGCACAAAAGTTTAACGGCCTTACTGTTTTGCCACCTTTGCTCAC
 AGATGAAATGATTGCTCAATACACTTCTGCACTGTTAGCGGGTACAATCACTTCTG
 10 GTTGGACCTTTGGTGCAGGTGCTGCATTACAAATACCATTTGCTATGCAAATGGCT
 TATAGGTTTAATGGTATTGGAGTTACACAGAATGTTCTCTATGAGAACCAAAAATTG
 ATTGCCAACCAATTTAATAGTGCTATTGGCAAAATTCAAGACTCACTTTCTTCCACA
 GCAAGTGCACTTGGAACCTTCAAGATGTGGTCAACCAAAATGCACAAGCTTTAAA
 CACGCTTGTTAAACAACCTTAGCTCCAATTTTGGTGCAATTTCAAGTGTTTTAAATGA
 15 TATCCTTTCACGTCTTGACAAAGTTGAGGCTGAAGTGCAAATTGATAGGTTGATCA
 CAGGCAGACTTCAAAGTTTGCAGACATATGTGACTCAACAATTAATTAGAGCTGCA
 GAAATCAGAGCTTCTGCTAATCTTGCTGCTACTAAAATGTCAGAGTGTGTACTTGG
 ACAATCAAAAAGAGTTGATTTTTGTGGAAAGGGCTATCATCTTATGTCCTTCCCTC
 AGTCAGCACCTCATGGTGTAGTCTTCTTGCTGCTGACTTATGTCCCTGCACAAGAA
 20 AAGAACTTCACAACTGCTCCTGCCATTTGTCATGATGGAAAAGCACACTTTCCTCG
 TGAAGGTGTCTTTGTTTCAAATGGCACACACTGGTTTGTAACACAAAGGAATTTTT
 ATGAACCACAAATCATTACTACAGACAACACATTTGTGTCTGGTAACTGTGATGTT
 GTAATAGGAATTGTCAACAACACAGTTTATGATCCTTTGCAACCTGAATTAGACTC
 ATTC AAGGAGGAGTTAGATAAATATTTTAAGAATCATACATCACCAGATGTTGATTT
 25 AGGTGACATCTCTGGCATTAAATGCTTCAGTTGTAAACATTCAAAAAGAAATTGACC
 GCCTCAATGAGGTTGCCAAGAATTTAAATGAATCTCTCATCGATCTCCAAGAACTT
 GGAAAGTATGAGCAGTATATAAAATGGCCATGGTACATTTGGCTAGGTTTTATAGC
 TGGCTTGATTGCCATAGTAATGGTGACAATTATGCTTTGCTGTATGACCAGTTGCT
 GTAGTTGTCTCAAGGGCTGTTGTTCTTGTGGATCCTGCTGCAAATTTGATGAAGAC
 30 GACTCTGAGCCAGTGCTCAAAGGAGTCAAATTACATTACACATAA

La mutación “K417T” se refiere a una mutación en el aminoácido 417 de la proteína S
 del virus en la que se produce un cambio de lisina (K) por treonina (T), provocado por
 una sustitución de una (A) por una (C). De esta forma, el codón AAG (que codifica para
 35 la lisina) pasa a ser ACG (que codifica para la treonina). La mutación “K417N” se refiere

a una mutación en el aminoácido 417 de la proteína S del virus en la que se produce un cambio de lisina (K) por asparagina (N), provocado por una sustitución de una (G) por una (T). De esta forma, el codón AAG (que codifica para la lisina) pasa a ser AAT (que codifica para la asparagina). Estas dos mutaciones aparecen representadas en la invención como “K417T/N”.

La mutación “L452R” se refiere a una mutación en el aminoácido 452 de la proteína S del virus en la que se produce un cambio de leucina (L) por arginina (R), provocado por una sustitución de una (T) por una (G). De esta forma, el codón CTG (que codifica para la leucina) pasa a ser CGG (que codifica para la arginina). La mutación “L452Q” se refiere a una mutación en el aminoácido 452 de la proteína S del virus en la que se produce un cambio de leucina (L) por glutamina (Q), provocado por una sustitución de una (T) por una (A). De esta forma, el codón CTG (que codifica para la leucina) pasa a ser CAG (que codifica para la glutamina). Estas dos mutaciones aparecen representadas en la invención como “L452R/Q”.

La mutación “T478K” se refiere a una mutación en el aminoácido 478 de la proteína S del virus en la que se produce un cambio de treonina (T) por lisina (K), provocado por una sustitución de una (G) por una (T). De esta forma, el codón TGT (que codifica para la treonina) pasa a ser TTT (que codifica para la lisina).

La mutación “E484K” se refiere a una mutación en el aminoácido 484 de la proteína S del virus en la que se produce un cambio de ácido glutámico (E) por lisina (K), provocado por una sustitución de una (G) por una (A). De esta forma, el codón GAA (que codifica para el ácido glutámico) pasa a ser AAA (que codifica para la lisina). La mutación “E484Q” se refiere a una mutación en el aminoácido 484 de la proteína S del virus en la que se produce un cambio de ácido glutámico (E) por glutamina (Q), provocado por una sustitución de una (G) por una (C). De esta forma, el codón GAA (que codifica para el ácido glutámico) pasa a ser CAA (que codifica para la glutamina). Estas dos mutaciones aparecen representadas en la invención como “E484K/Q”.

En otra realización preferida, las sondas de la invención están marcadas con al menos un fluoróforo, preferiblemente VIC, NED o FAM, más preferiblemente en cualquiera de sus extremos, 5' o 3', aún más preferiblemente en su extremo 3'.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un kit, de ahora en adelante “kit de la invención”, que comprende al menos un conjunto de sondas y cebadores de la invención.

- 5 En una realización preferida, el kit de la invención comprende todos los conjuntos de sondas y cebadores de la invención.

Además de las sondas y cebadores de la invención, el kit puede comprender otros componentes útiles en la puesta en práctica de la presente invención, tales como, buffers, soportes del material, componentes de controles positivos y/o negativos, etc. 10 Además de los componentes mencionados, los kits podrán incluir también instrucciones para practicar el objeto de la invención. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits mencionados en una variedad de formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, p. ej., una hoja u hojas de 15 papel en las que se imprime la información, en el embalaje del kit, en un inserto de paquete, etc. Otro medio sería un medio legible por ordenador, por ejemplo, un CD, un USB, etc., en el que se haya registrado la información. Otro medio que puede estar presente es una dirección de sitio web que puede utilizarse a través de Internet para 20 acceder a la información en un sitio remoto. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

En otra realización preferida, el kit de la invención comprende, además, sondas y cebadores específicos para la detección de mutaciones en la posición 501 de la proteína S del virus SARS-CoV-2, preferiblemente la mutación N501Y. 25

El término “detectar” o “detección” ha sido definido o explicado en párrafos anteriores, y dicha definición es aplicable al presente aspecto inventivo, que en este caso se refiere a reportar o identificar las secuencias de las variantes del virus SARS-CoV-2 que 30 presentan mutaciones en la posición 501 de la proteína S.

La mutación “N501Y” se refiere a una mutación en el aminoácido 501 de la proteína S del virus en la que se produce un cambio de asparagina (N) por tirosina (Y), provocado por una sustitución de una (A) por una (T). De esta forma, el codón AAT (que codifica 35 para la asparagina) pasa a ser TAT (que codifica para la tirosina).

En una realización más preferida, las sondas y cebadores que detectan la mutación en la posición 501 de la proteína S son un cebador directo que comprende, preferiblemente consiste en, la secuencia SEQ ID NO:20, un cebador inverso que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:21, una sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:22 y una sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:23.

De esta forma, el kit de la invención puede comprender uno o más conjuntos de las sondas y cebadores de la invención que comprenden, preferiblemente consisten en, las secuencias SEQ ID NO: 1-23.

En otra realización preferida, las sondas del kit de la invención están marcadas con al menos un fluoróforo, preferiblemente VIC, NED o FAM, más preferiblemente en cualquiera de sus extremos, 5' o 3', aún más preferiblemente en su extremo 3'.

A lo largo de los párrafos anteriores se ha puesto de manifiesto la utilidad de las sondas y cebadores de la invención en la detección de las mutaciones en las posiciones 417, 452, 478, 484 y/o 501 de la proteína S del virus SARS-CoV-2.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso del conjunto de sondas y cebadores de la invención, o del kit de la invención, para la detección y/o cuantificación *in vitro* de variantes de SARS-CoV-2 portadoras de mutaciones (SNP) en las posiciones 417, 452, 478, 484 y/o 501 de la proteína S, donde las mutaciones son seleccionadas del grupo que consiste en: K417T/N, L452R/Q, T478K, E484K/Q y N501Y.

El término “detectar” o “detección” ha sido definido o explicado en párrafos anteriores, y dicha definición es aplicable al presente aspecto inventivo.

El término “cuantificar” o “cuantificación” se refiere a determinar, en una muestra, la cantidad de moléculas molde de DNA o RNA (determinar la carga vírica) de las variantes del virus SARS-CoV-2 que presentan mutaciones en las posiciones 417, 452, 478, 484 y/o 501 de la proteína S.

El término “*in vitro*” se refiere a que la detección y/o cuantificación de las variantes del SARS-CoV-2 se realiza fuera del cuerpo del sujeto. El término “sujeto”, tal como se

utiliza en la presente invención, hace referencia a cualquier animal, preferiblemente un mamífero. En una realización más preferida, el sujeto es un ser humano de cualquier sexo, edad o raza.

5 De forma análoga al uso de las sondas y cebadores de la invención, así como al uso del kit de la invención, descrito en párrafos anteriores, en la presente invención también se contemplan los métodos dirigidos a la detección y/o cuantificación de las variantes del SARS-CoV-2 portadoras de mutaciones en las posiciones 417, 452, 478, 484 y/o 501 de la proteína S.

10

De esta forma, otro aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro*, de ahora en adelante “método de la invención” para la detección y/o cuantificación de variantes de SARS-CoV-2 portadoras de mutaciones en las posiciones 417, 452, 478, 484 y/o 501 de la proteína S, en una muestra aislada de un sujeto que comprende:

15

- a. extraer el ARN viral de la muestra,
- b. someter al ARN extraído en (a) a una reacción de transcripción inversa seguida de una reacción de amplificación utilizando el conjunto de sondas y cebadores de la invención o el kit de la invención, y
- c. detectar la presencia de dichas mutaciones en la muestra amplificada.

20

Los términos “*in vitro*”, “sujeto”, “detectar” o “detección”, “cuantificar” o “cuantificación” han sido definidos o explicados en párrafos anteriores, y dichas definiciones son aplicables al presente aspecto inventivo.

25

La detección y/o cuantificación de las variantes del SARS-CoV-2 que presentan mutaciones en las posiciones 417, 452, 478 y/o 484 de la proteína S mediante las sondas y cebadores de la invención puede llevarse a cabo en cualquier muestra que sea susceptible de estar contaminada por SARS-CoV-2. Se entiende por “muestra” a una parte o cantidad pequeña de una cosa que se considera representativa del total y que se toma o se separa de ella para someterla a estudio, análisis o experimentación.

30

En la presente invención, dicho estudio, análisis o experimentación hace referencia a la presencia/ausencia del material genético de las variantes de SARS-CoV-2. Dentro del término “muestra” también se incluyen muestras que han sido manipuladas de alguna manera después de su obtención, por ejemplo, mediante el tratamiento con reactivos, la solubilización o el enriquecimiento de ciertos componentes. En una realización

35

preferida del uso de la invención, la muestra es una muestra biológica.

El término “muestra biológica” incluye, pero sin limitarnos, tejidos y/o fluidos biológicos de un individuo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. La muestra biológica a la que se refiere la invención comprende ácido ribonucleico (ARN). En una realización preferida, la muestra biológica procede del tracto oral o respiratorio y ha sido obtenida, más preferiblemente, mediante un hisopo nasofaríngeo.

En otra realización preferida, la reacción de amplificación del método de la invención es una RT-PCR, más preferiblemente una RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR). La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) es una variante de la PCR en la que se retrotranscribe una cadena de ARN en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa o transcriptasa reversa, y el resultado se amplifica mediante una PCR tradicional.

La extracción del ARN del paso (a) del método de la invención se puede realizar por los métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, pueden emplearse métodos de extracción tanto manuales, basados en el empleo de solventes orgánicos o columnas de centrifugación, como automatizados, por ejemplo, las plataformas Microlab (Hamilton Company, Nevada, EE. UU.) o los sistemas Magnapure (Roche, Basilea, Suiza).

En el paso (b) la reacción de transcripción inversa consta, preferiblemente, de dos pasos. El primer paso de la etapa de retrotranscripción consiste en la síntesis de copias del genoma viral en forma de cDNA. Las condiciones empleadas en este primer paso dependen del reactivo utilizado. Este primer paso es llevado a cabo durante preferiblemente 15 minutos a una temperatura de entre 35 °C – 52 °C, más preferiblemente a 50 °C. Las condiciones del segundo paso de la etapa de retrotranscripción son, preferiblemente, 2 minutos a 95 ° C.

Posteriormente a la retrotranscripción, en el paso (b) del método de la invención se lleva a cabo la amplificación para la detección de la variante de interés usando para cada posición dos cebadores de la invención y dos o tres sondas de la invención (Taqman MGB), preferiblemente marcadas con fluoróforos, más preferiblemente VIC, NED o

FAM, que reconocen la secuencia salvaje y las diferentes mutaciones en las posiciones 417, 452, 478, 484 y/o 501 (Tabla1).

Tabla 1. Cebadores y sondas para la detección de las mutaciones K417N/T, L452R/Q, T478K, E484K/Q y N501Y.

	Posición	Mutación	Función	Nombre	Secuencia (5'-3') ¹
SEQ ID NO:1	417		Cebador Fwd	CoV-417/452-Fwd	AGGTGATGAAGTCAGACAAATCG
SEQ ID NO:2			Cebador Rev	CoV-417-Rev	CCAAGCTATAACGCAGCCTGTA
SEQ ID NO:3		K417	Sonda FAM	CoV-WT-K417-FAM	AAGTGGAA AG ATTGCT
SEQ ID NO:4		K417T	Sonda VIC	CoV-Mut-T417-VIC	AAGTGGAA CG ATTGCT
SEQ ID NO:5		K417N	Sonda NED	CoV-Mut-N417-NED	AAGTGGAA AT ATTGCT
SEQ ID NO:6	452		Cebador Fwd	CoV-417/452-Fwd	AGGTGATGAAGTCAGACAAATCG
SEQ ID NO:7			Cebador Rev	CoV-452/478/484/501-Rev	AACAGTTGCTGGTGCATGTAGAA
SEQ ID NO:8		L452	Sonda VIC	CoV-WT-L452-VIC	ATTAC CT GTATAGATTGT
SEQ ID NO:9		L452R	Sonda NED	CoV-Mut-R452-NED	ATTAC CGG TATAGATTGT
SEQ ID NO:10		L452Q	Sonda FAM	CoV-Mut-Q452-FAM	ATTAC CA GTATAGATTGT
SEQ ID NO:11	478		Cebador Fwd	CoV-478-Fwd	CTTTTGAGAGAGATATTTCAACTGAAA
SEQ ID NO:12			Cebador Rev	CoV-452/478/484/501-Rev	AACAGTTGCTGGTGCATGTAGAA
SEQ ID NO:13		T478	Sonda VIC ²	CoV-WT-T478-VIC	TACAAGGT GT GCTACC
SEQ ID NO:14		T478K	Sonda FAM ²	CoV-Mut-K478-FAM	ATTACAAGG TTT GCTACC
SEQ ID NO:15	484		Cebador Fwd	CoV-484/501-Fwd	AATCTATCAGGCCGGTAGCACA
SEQ ID NO:16			Cebador Rev	CoV-452/478/484/501-Rev	AACAGTTGCTGGTGCATGTAGAA
SEQ ID NO:17		E484	Sonda NED	CoV-WT-E484-NED	AATGGTGTT GA AGGTTT
SEQ ID NO:18		E484K	Sonda FAM	CoV-Mut-K484-FAM	AATGGTGTT AA AGGTTT
SEQ ID NO:19		E484Q	Sonda VIC	CoV-Mut-Q484-VIC	AATGGTGTT CA AGGTTT
SEQ ID NO:20	501		Cebador Fwd	CoV-484/501-Fwd	AATCTATCAGGCCGGTAGCACA
SEQ ID NO:21			Cebador Rev	CoV-452/478/484/501-Rev	AACAGTTGCTGGTGCATGTAGAA
SEQ ID NO:22		N501	Sonda FAM	CoV-WT-N501-FAM	CCACT TA TGGTGTTGGT
SEQ ID NO:23		N501Y	Sonda VIC	CoV-Mut-Y501-VIC	CCACT TAT GTTGTTGGT

¹El codón susceptible de mutación aparece sombreado. El nucleótido variable se indica en negrita.

²Secuencia reversa complementaria.

- 10 Para llevar a cabo la detección de las variantes del virus SARS-CoV-2 se preparan, preferiblemente, 5 reacciones, una para cada posición. En cada una de ellas se mezcla el ARN viral, previamente extraído de la muestra biológica en el paso (a), con el reactivo A. El reactivo A se prepara mezclando el reactivo comercial Taqman fast virus 1-step master mix (Roche) y los cebadores y las sondas de la invención específicas para cada
- 15 mutación a analizar o el kit de la invención.

Para la detección de las mutaciones K417T/N se emplea un cebador directo que

comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:1, un cebador inverso que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:2, una sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:3, una sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:4, y una sonda que comprende,
5 preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:5.

Para la detección de las mutaciones L452R/Q se emplea un cebador directo que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:6, un cebador inverso que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:7, una sonda que comprende,
10 preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:8, una sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:9, y una sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:10.

Para la detección de la mutación T478K se emplea un cebador directo que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:11, un cebador inverso que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:12, una sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:13, y una sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:14.

20 Para la detección de las mutaciones E484K/Q se emplea un cebador directo que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:15, un cebador inverso que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:16, una sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:17, una sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:18, y una sonda que comprende,
25 preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:19.

Para la detección de la mutación N501Y se emplea un cebador directo que comprende, preferiblemente consiste en, la secuencia SEQ ID NO:20, un cebador inverso que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:21, una sonda que comprende,
30 preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:22 y una sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:23.

La amplificación del paso (b) del método de la invención y el posterior análisis y detección de las mutaciones se realiza preferiblemente en un sistema de PCR a tiempo
35 real tipo 7500 thermal cycler (ABI), Steponeplus thermal cycler (ABI) o QuantStudio 5

(ABI).

En el paso (c) del método de la invención, la expresión “detectar la presencia de dichas mutaciones en la muestra amplificada” se refiere a detectar si las sondas y cebadores
 5 diseñados por los inventores han hibridado, unido o reconocido a los SNPs específicos descritos en la invención. Los diagramas de amplificación (señales de fluorescencia) varían en función del fluoróforo de las sondas. Los tres fluoróforos preferidos con los que se marcan las sondas de la invención pueden ser excitados a una sola longitud de onda (λ) de 488 nm, pero emiten a longitudes de onda claramente diferentes. FAM tiene
 10 una λ máxima de absorción de 494 nm y una λ máxima de emisión de 518 nm, NED tiene una λ máxima de absorción de 546 nm y una λ máxima de emisión de 575 nm y VIC tiene una λ máxima de absorción de 538 nm y una λ máxima de emisión de 554 nm.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

Fig. 1 muestra la posición de los cebadores de la invención para la detección de las mutaciones K417T/N, L452R/Q, T478K, E484K/Q y N501Y de la proteína S del virus SARS-CoV-2.

20 **Fig. 2** muestra el análisis mediante la técnica desarrollada de muestras positivas para la detección de la mutación T478K de la proteína S del virus SARS-CoV-2 (variante Delta).

EJEMPLOS

25

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de las sondas y cebadores de la invención, así como del método de la invención.

30 Ejemplo 1: Preparación del reactivo A

Como se ha comentado en la descripción de la invención, se preparan 5 reacciones, una para cada posición:

35 (1) Detección de las mutaciones K417T/N. Para preparar 1 mililitro de volumen del

reactivo A se añaden 300 µl de Taqman fast virus 1-step master mix (Roche), 4 µl del cebador directo (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:1, 4 µl del cebador inverso (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:2, 1 µl de la sonda (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:3, 1 µl de la sonda (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:4 y 1 µl de la sonda (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:5. Se añade agua hasta completar el mililitro de volumen.

(2) Detección de las mutaciones L452R/Q. Para preparar 1 mililitro de volumen del reactivo A se añaden 300 µl de Taqman fast virus 1-step master mix (Roche), 4 µl del cebador directo (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:6, 4 µl del cebador inverso (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:7, 1 µl de la sonda (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:8, 1 µl de la sonda (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:9 y 1 µl de la sonda (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:10. Se añade agua hasta completar el mililitro de volumen.

(3) Detección de la mutación T478K. Para preparar 1 mililitro de volumen del reactivo A se añaden 300 µl de Taqman fast virus 1-step master mix (Roche), 4 µl del cebador directo (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:11, 4 µl del cebador inverso (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:12, 1 µl de la sonda (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:13 y 1 µl de la sonda (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:14. Se añade agua hasta completar el mililitro de volumen.

(4) Detección de las mutaciones E484K/Q. Para preparar 1 mililitro del reactivo A se añaden 300 µl de Taqman fast virus 1-step master mix (Roche), 4 µl del cebador directo (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:15, 4 µl del cebador inverso (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:16, 1 µl de la sonda (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:17, 1 µl de la sonda (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:18 y 1 µl de la sonda (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:19. Se añade agua hasta completar el mililitro de volumen.

(5) Detección de la mutación N501Y. Para preparar 1 mililitro del reactivo A se añaden

- 300 µl de Taqman fast virus 1-step master mix (Roche), 4 µl del cebador directo (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:20, 4 µl del cebador inverso (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:21, 1 µl de la sonda (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:22 y
- 5 1 µl de la sonda (100 µM) que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:23. Se añade agua hasta completar el mililitro de volumen.

Ejemplo 2: Preparación de la mezcla de amplificación

- 10 Se preparan 5 reacciones en las que se mezclan 5 µl de ARN viral previamente extraído y 10 µl del reactivo A previamente preparado para cada una de las reacciones según se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 3: Amplificación

- 15 El sistema de amplificación empleado es una PCR a tiempo real tipo 7500 thermal cycler (ABI), Steponeplus thermal cycler (ABI) o QuantStudio 5 (ABI).

- 20 La etapa de retrotranscripción tiene 2 pasos. El primer paso de la etapa de retrotranscripción (15 minutos a 50 ° C) consiste en la síntesis de cDNA a partir del ARN viral. Las condiciones del segundo paso de la etapa de retrotranscripción son 2 minutos a 95 ° C (Tabla 2).

- 25 La etapa de PCR de 40 ciclos consta de 2 pasos, un paso de desnaturalización de 5 segundos a 95 ° C y un paso combinado de hibridación y extensión de 30 segundos a 60 ° C. Durante estos ciclos el producto de PCR es amplificado (Tabla 2).

Tabla 2. Programa de amplificación

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo	Modo adquisición
x 1 ciclo	50°C	15:00	Ninguno
x 1 ciclo	95°C	2:00	Ninguno
x 40 ciclos	95°C	00:05	Ninguno

60°C

00:30

Único

Ejemplo 4: Obtención e interpretación de los resultados

La lectura de los resultados llega por la interpretación (por el sistema) de la intensidad de la señal fluorescente en el momento que se identifique la presencia de la secuencia genética correspondiente al virus. Un ejemplo de la detección de la mutación T478K en la proteína S del virus se muestra en la Fig.2. Se observan variantes portadoras del alelo salvaje T478 (gris claro) y mutante T478K (gris oscuro), que permite identificar la variante Delta. Este análisis se realizó en un sistema StepOnePlus (Thermofisher).

La variante Alfa (B.1.1.7) se caracteriza porque presenta las mutaciones E484K, N501Y, la variante Beta (B.1.351) se caracteriza porque presenta las mutaciones K417N, E484K y N501Y, la variante Gamma (P.1) se caracteriza porque presenta las mutaciones K417N, E484K y N501Y, la variante Kappa (B.1.617.1) se caracteriza porque presenta las mutaciones L452R, T478K y E484Q, la variante Delta (B.1.617.2) se caracteriza porque presenta las mutaciones L452R y T478K y la variante Lambda (C.37) se caracteriza porque presenta la mutación L452Q.

Tal y como se ve en los resultados de detección de la Tabla 3, el método de la invención permite la detección de las variantes Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1.), Kappa (B.1.617.1), Delta (B.1.617.2) y Lambda (C.37) portadoras de mutaciones en los codones 417, 452, 478, 484 y 501 en apenas una hora.

Tabla 3. Detección de las variantes del virus SAR-CoV-2 mediante las sondas y cebadores de la invención

POSICION	CODON	Aa	VARIANTES						Sonda
			B.1.1.7 Alfa	B.1.351 Beta	P.1 Gamma	B.1.617.1 Kappa	B.1.617.2 Delta	C.37 Lambda	
417	AAG	K	√			√	√	√	FAM
	ACG	T			√				VIC
	AAT	N		√					NED
452	CTG	L	√		√				VIC
	CGG	R				√	√		NED

ES 2 946 232 A1

	CAG	Q					√	FAM
478	GAA	T	√		√	√	√	VIC
	CAA	K					√	FAM
484	GAA	E	√				√	NED
	AAA	K		√	√			FAM
	CAA	Q				√		VIC
501	AAT	N				√	√	FAM
	TAT	Y	√	√	√			VIC

REIVINDICACIONES

1. Kit para la detección de mutaciones en las posiciones 417, 452, 478 y/o 484 de la proteína S del virus SARS-CoV-2 que comprende todos los conjuntos de sondas y cebadores específicos de la lista que consiste en:
 - a) Cebador directo que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:1, cebador inverso que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:2, sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:3, sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:4, y sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:5;
 - b) Cebador directo que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:6, cebador inverso que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:7, sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:8, sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:9, y sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:10;
 - c) Cebador directo que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:11, cebador inverso que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:12, sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:13, y sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:14; y
 - d) Cebador directo que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:15, cebador inverso que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:16, sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:17, sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:18, y sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:19.
2. Kit según la reivindicación 1 donde las secuencias de (a) detectan las mutaciones K417T y K417N, las secuencias de (b) detectan las mutaciones L452R y L452Q, las secuencias de (c) detectan la mutación T478K y las secuencias de (d) detectan las mutaciones E484K y E484Q.
3. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde las sondas están marcadas con al menos un fluoróforo.
4. Kit según la reivindicación 3, donde el fluoróforo es VIC, NED o FAM.

5. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que además comprende sondas y cebadores específicos para la detección de mutaciones en la posición 501 de la proteína S del virus SARS-CoV-2.
- 5 6. Kit según la reivindicación 5 donde la mutación en la posición 501 es N501Y.
7. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6 donde las sondas y cebadores que detectan la mutación en la posición 501 de la proteína S son un cebador directo que comprende, preferiblemente consiste en, la secuencia SEQ ID NO:20, un cebador
10 inverso que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:21, una sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:22 y una sonda que comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO:23.
8. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 donde las sondas para la detección
15 de mutaciones en la posición 501 de la proteína S del virus SARS-CoV-2 están marcadas con al menos un fluoróforo.
9. Kit según la reivindicación 8, donde el fluoróforo es VIC, NED o FAM.
- 20 10. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la detección y/o cuantificación *in vitro* de variantes del virus SARS-CoV-2 portadoras de mutaciones (SNP) en las posiciones 417, 452, 478, 484 y/o 501 de la proteína S, donde las mutaciones son seleccionadas del grupo que consiste en: K417T, K417N, L452R, L452Q, T478K, E484K, E484Q y N501Y.
- 25 11. Método *in vitro* para la detección y/o cuantificación de variantes del virus SARS-CoV-2 portadoras de mutaciones en las posiciones 417, 452, 478, 484 y/o 501 de la proteína S en una muestra aislada de un sujeto, que comprende:
 - a. extraer el ARN viral de la muestra,
 - 30 b. someter al ARN extraído en (a) a una reacción de transcripción inversa seguida de una reacción de amplificación utilizando el kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y
 - c. detectar la presencia de dichas mutaciones en la muestra amplificada.
- 35 12. Método según la reivindicación 11, donde la reacción de amplificación es una RT-

PCR cuantitativa (qRT-PCR).

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, donde la muestra aislada
de un sujeto es una muestra biológica procedente de un mamífero, preferiblemente
5 humano.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde la muestra biológica
aislada procede del tracto oral o respiratorio.

10

Fig. 1

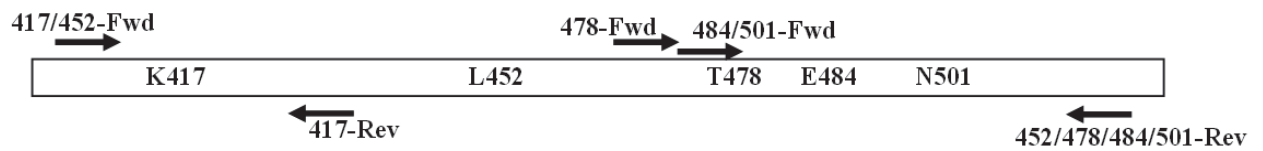
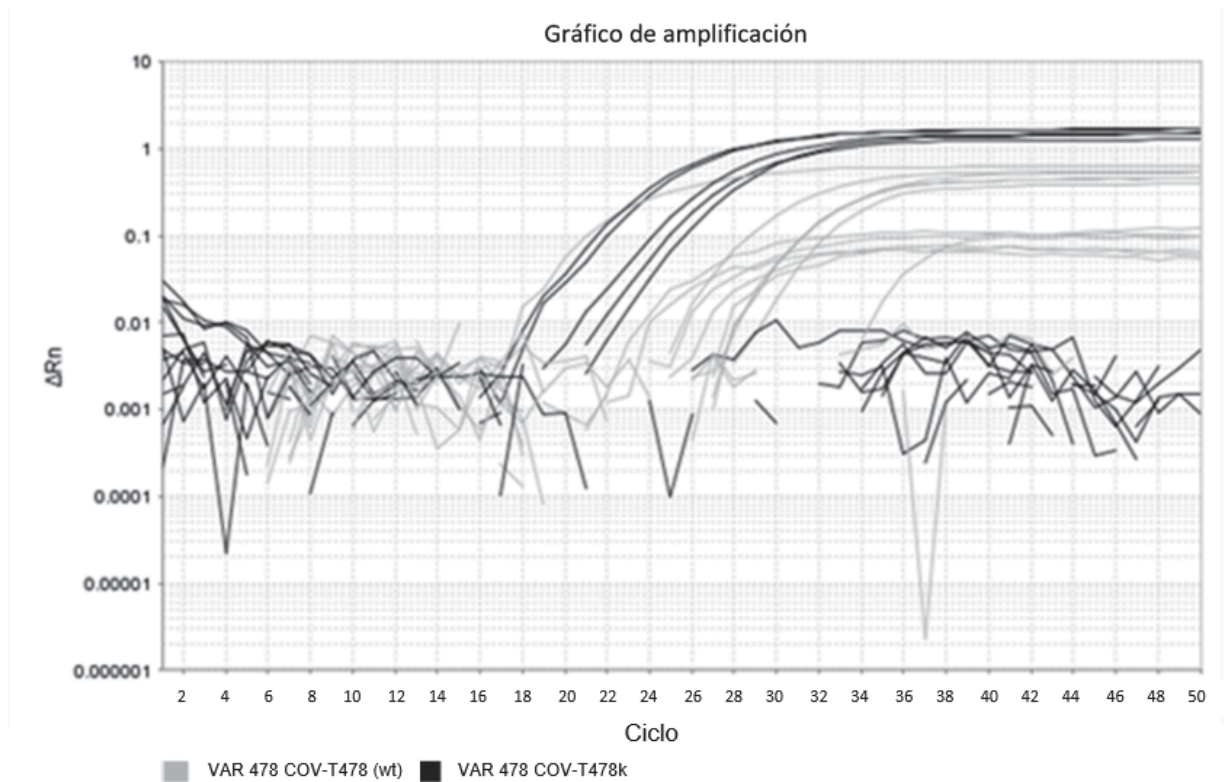


Fig. 2





- ②① N.º solicitud: 202230021
②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.01.2022
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. cl.: **C12Q1/6888** (2018.01)
C12N15/50 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CN 113897460 A (SHENZHEN ZIJIAN BIO TECH CO LTD) 07/01/2022, todo el documento.	1-14
X	LIANG, Y, et al. CRISPR-Cas12a-based detection for the major SARS-CoV-2 variants of concern. Microbiology Spectrum. Diciembre 2021, Vol. 9, N° 3, Artículo N°: e01017-21. ISSN 2165-0497 (impreso), ISSN 2165-0497 (electrónico), <DOI:10.1128/Spectrum.01017-21>. Especialmente: páginas 7 - 9; tabla 1.	1-14
A	CN 113881812 A (SHENZHEN UNI MEDICA TECH CO LTD) 04/01/2022, todo el documento.	1-14
A	WANG, H. et al. Multiplex SARS-CoV-2 genotyping reverse transcriptase PCR for population-level variant screening and epidemiologic surveillance. Journal of Clinical Microbiology. Agosto 2021, Vol. 59, N° 8, Artículo N°: e0085921. ISSN 1098-660X (electrónico), <DOI:10.1128/JCM.00859-21>. Especialmente: página 2, primer párrafo; página 4, último párrafo - página 5, segundo párrafo; página 7; página 10, tercer párrafo.	1-14

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
11.11.2022

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/2

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

C12Q, C12N

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, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC, TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE, TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, TXPES, TXPEU, TXPEY, TXPEPEA, TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPW0EA, TXPFA, TXPFB, TXPFC, TXPFE, TXPFF, TXPFM, TXPFT, TXPEPFA, TXPW0FA, TXPGA, TXPGB, TXPGC, TXPGT, TXPGU, TXPEPGA, TXPW0GA, EM_ALL, EM_VRL, NRNL1