



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 273 371**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97935208 .5**

86 Fecha de presentación : **30.07.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **0915991**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.05.1999**

54 Título: **Método de amplificación de ácido nucleico basado en ramificación-extensión (RAM) y transcripción *in vitro*.**

30 Prioridad: **31.07.1996 US 690494**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

73 Titular/es: **Hamilton Thorne Biosciences, Inc.**
100 Cummings Center, Suite 465E
Beverly, Massachusetts 01915, US

72 Inventor/es: **Zhang, David Y.;**
Brandwein, Margaret y
Hsuih, Terence

74 Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

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

DESCRIPCIÓN

Método de amplificación de ácido nucleico basado en ramificación-extensión (RAM) y transcripción *in vitro*.

5 **Campo técnico**

La presente descripción se refiere a ensayos y kits para realizar dichos ensayos para la detección rápida automatizada de agentes patógenos infecciosos y genes normales y anómalos.

10 **Antecedentes de la invención**

Recientemente se han desarrollado varias técnicas para cumplir con las demandas de una detección rápida y precisa de agentes infecciosos, tales como virus, bacterias y hongos, y con la detección de genes normales y anómalos. Estas técnicas, que generalmente implican la amplificación y detección (y posterior medida) de cantidades insignificantes de ácidos nucleicos dianas (ADN o ARN) en una muestra de ensayo, incluyen entre otros, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki, y col., Science 230:1350, 1985; Saiki y col., Science 239:487, 1988; PCR Technology, Henry A. Erlich, editor., Stockton Press, 1989; Patterson y col. Science 260:976, 1993); reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189, 1991); amplificación por desplazamiento de la cadena (SDA) (Walker y col., Nucl. Acids Res. 20:1691, 1992), amplificación por replicasa Q β (Q β RA) (Wu y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11769, 1992; Lomeli y col., Clin. Chem. 35:1826, 1989) y replicación automantenida (3SR) (Guatelli y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878, 1990). Aunque todas estas técnicas son potentes herramientas para la detección e identificación de cantidades insignificantes de un ácido nucleico diana en una muestra, todas tienen diversos problemas, que han evitado su aplicación general en el ámbito del laboratorio clínico para su uso como técnicas rutinarias de diagnóstico.

Uno de los problemas más difíciles es la preparación del ácido nucleico diana antes de realizar su amplificación y detección. Este procedimiento requiere tiempo y es laborioso y, de este modo, generalmente es inapropiado para un ámbito clínico donde se requieren resultados rápidos y precisos. Otro problema, especialmente para PCR y SDA, es que las condiciones de amplificación del ácido nucleico diana para su posterior detección y cuantificación opcional varían en cada ensayo, es decir, no hay condiciones constantes que favorezcan la estandarización del ensayo. Este último problema es especialmente crítico para la cuantificación de un ácido nucleico diana mediante PCR competitiva y para la detección simultánea de ácidos nucleicos diana múltiples.

La elusión de los problemas mencionados anteriormente permitiría el desarrollo de ensayos estandarizados rápidos, utilizando las diversas técnicas mencionadas anteriormente, que serían especialmente útiles para realizar investigaciones epidemiológicas, así como en el ámbito del laboratorio clínico para detectar microorganismos y virus patógenos en una muestra de un paciente. Estos microorganismos causan enfermedades infecciosas que representan una amenaza importante para la salud humana. El desarrollo de técnicas analíticas estandarizadas y automatizadas y de kits para ello, basándose en la identificación rápida y sensible de ácidos nucleicos dianas específicos de un agente de enfermedad infecciosa proporcionaría ventajas sobre técnicas que implican detección inmunológica o cultivos de bacterias y virus.

Pueden diseñarse reactivos que sean específicos para un organismo en particular o para una gama de organismos relacionados. Estos reactivos podrían utilizarse para ensayar directamente genes microbianos que confieren resistencia a diversos antibióticos y factores de virulencia que dan como resultado la enfermedad. El desarrollo de técnicas analíticas estandarizadas rápidas ayudará a la selección del tratamiento apropiado.

En algunos casos, pueden ser suficientes ensayos que tengan un grado de sensibilidad moderado (pero elevada especificidad), por ejemplo, en ensayos de análisis inicial. En otros casos, en los que se requiere una gran sensibilidad (así como especificidad), por ejemplo, la detección del genoma del VIH en una muestra infectada puede requerir encontrar las secuencias del ácido nucleico del virus presente en una muestra a razón de una parte entre 10 a 100.000 equivalentes de genoma humano (Harper y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:772, 1986).

Los contaminantes sanguíneos, incluyendo entre otros, VIH, HTLV-1, hepatitis B y hepatitis C, representan una amenaza seria para la transfusión a pacientes y sería muy beneficioso para la aceptación del diagnóstico clínico del laboratorio el desarrollo de ensayos de diagnóstico rutinario, que impliquen los ácidos nucleicos de estos agentes para la detección rápida y sensible de estos agentes. Por ejemplo, el genoma del VIH puede detectarse en una muestra de sangre usando técnicas de PCR, bien como una molécula de ARN que representa a la partícula viral libre o como una molécula de ADN que representa el provirus integrado (Ou y col., Science 239:295, 1988; Murakawa y col. DNA 7:287, 1988).

Además, las investigaciones epidemiológicas que usan técnicas clásicas de cultivo indicaron que la infección con *Mycobacterium avium* intracelular (MAI) diseminada es una complicación de la etapa tardía del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en niños y adultos. Sin embargo, no está claro el alcance exacto del problema, ya que los procedimientos de cultivo actuales para detectar micobacterias son engorrosos, lentos y de dudosa sensibilidad. De este modo, sería deseable y muy beneficioso disponer de una técnica rápida, sensible y específica para la detección de MAI, para proporcionar una imagen definitiva de la implicación en individuos infectados por VIH y en otros inmunodeprimidos. Estos estudios podrían implicar metodologías de biología molecular, basándose en la detección

de un ácido nucleico diana, que han demostrado, de forma rutinaria, ser más sensibles que los sistemas de cultivo convencionales (Boddinghaus y col., J. Clin. Med. 28:1751, 1990).

Otras aplicaciones para estas técnicas incluyen la detección y caracterización de trastornos genéticos de un único gen en individuos y en poblaciones (véase, por ejemplo, Landergren y col., Science 241: 1077, 1988 que describen una técnica de ligamiento para detectar defectos únicos en genes, incluyendo mutaciones puntuales). Tales técnicas podrían ser capaces de distinguir claramente diferencias de un único nucleótido (mutaciones puntuales) que pueden dar lugar a una enfermedad (por ejemplo, anemia de células falciformes), así como secuencias genéticas delecionadas o duplicadas (por ejemplo, talasemia).

El documento WO9535390 describe un procedimiento para detectar un ácido nucleico diana en una muestra que comprende:

(a) poner en contacto el ácido nucleico de la muestra en condiciones que permitan la hibridación del ácido nucleico entre secuencias complementarias en los ácidos nucleicos con sondas oligonucleotídicas, en el que las sondas oligonucleotídicas además comprenden una sonda de amplificación circularizable que tiene regiones 3' y 5' que son complementarias a secuencias adyacentes, pero no solapantes, en el ácido nucleico diana, estando separadas dichas regiones 3' y 5' por una región genérica que no es complementaria ni pueden hibridar con ninguna secuencia de nucleótidos del ácido nucleico diana, de modo que se forma un complejo que comprende el ácido nucleico diana y la sonda circularizable, en el que la sonda circularizable está unida en sus extremos 3' y 5' a secuencias adyacentes pero no solapantes del ácido nucleico diana;

(b) separar el complejo de los reactivos no unidos y lavar el complejo;

(c) ligar los extremos 3' y 5' de la sonda circularizable con un agente de ligamiento que une secuencias nucleotídicas, de modo que se forma una sonda de amplificación circular;

(d) amplificar la sonda de amplificación circular poniendo en contacto el complejo con un primer cebador de extensión que es complementario y puede hibridar con la porción genérica de la sonda de amplificación circular y con un segundo cebador de extensión que sustancialmente es idéntico a la porción genérica de la sonda de amplificación circular que no solapa con la porción de la región genérica a la que se une el primer cebador de extensión, dNTP y una ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de la cadena, en condiciones en las que el primer cebador de extensión se extiende alrededor de la sonda circular durante múltiples vueltas para formar un ADN de cadena sencilla de unidades repetidas complementario a la secuencia de la sonda circular, copias múltiples del segundo cebador de extensión que hibridan con regiones complementarias del ADN de cadena sencilla y que se extienden con la ADN polimerasa proporcionando productos de extensión y

(e) detectar el ADN amplificado, en el que la detección del mismo indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra.

Los procedimientos referidos anteriormente son procedimientos relativamente complejos que, como se indica, presentan inconvenientes que hacen difícil su uso en el laboratorio de diagnóstico clínico para diagnóstico rutinario y en estudios epidemiológicos de enfermedades infecciosas y anomalías genéticas. Todos los procedimientos descritos implican la amplificación del ácido nucleico diana que se va a detectar. El tiempo y el trabajo requeridos para la preparación del ácido nucleico diana, así como la variabilidad en la amplificación de los moldes (por ejemplo, el ácido nucleico diana específico cuya detección se está midiendo) y las condiciones hacen inadecuados a estos procedimientos para la estandarización y automatización requerida en el ámbito de laboratorio clínico.

El documento EP 0 359 789 describe un procedimiento para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, evitando la amplificación de ADN, tal como por PCR. Un cebador que comprende una secuencia promotora se hibrida con un ácido nucleico diana. Una porción del ácido nucleico diana se elimina mediante la exonucleasa 3' - 5', con lo cual la porción eliminada se sustituye por una nueva secuencia, usando la secuencia promotora del cebador hibridado como molde, dando lugar a un promotor de doble cadena que permite la transcripción del ácido nucleico diana.

La presente descripción se dirige al desarrollo de ensayos rápidos y sensibles útiles para la detección y control de organismos patógenos, así como a la detección de genes anómalos en un individuo. Además, la metodología de la presente descripción puede estandarizarse y automatizarse fácilmente para su uso en el ámbito del laboratorio clínico.

Resumen de la invención

Ahora se ha desarrollado un procedimiento mejorado que permite la detección y cuantificación rápida, sensible y estandarizada de ácidos nucleicos de microorganismos patógenos a partir de muestras de pacientes con enfermedades infecciosas. La metodología mejorada también permite una detección y cuantificación rápida y sensible de variaciones genéticas en ácidos nucleicos de muestras de pacientes con enfermedades genéticas o neoplasias.

Este procedimiento proporciona varias ventajas con respecto a procedimientos anteriores. El procedimiento simplifica el procedimiento de aislamiento del ácido nucleico diana, lo que puede realizarse, si se desea, en microtubos, microchips o placas de micropocillos. El procedimiento permite el aislamiento, amplificación y detección de secuen-

cias de ácido nucleico que corresponden con el ácido nucleico diana de interés que se realizará en el mismo recipiente de la muestra, por ejemplo, tubo o placa de micropocillos. El procedimiento permite la estandarización de las condiciones, ya que sólo puede utilizarse una única sonda de amplificación circularizable genérica en el presente procedimiento para detectar diversos ácidos nucleicos diana, permitiendo de este modo una amplificación múltiple eficaz. El procedimiento permite la detección directa del ARN mediante una amplificación con sonda sin la necesidad de producir un molde de ADN. Las sondas de amplificación, que en el procedimiento pueden estar unidas covalentemente extremo con extremo, forman una secuencia de amplificación ligada contigua. El ensamblaje del ADN amplificable mediante ligamiento aumenta la especificidad y hace posible la detección de una mutación única en una diana. Esta secuencia de amplificación ligada se amplifica, en lugar del ácido nucleico diana, permitiendo sustancialmente las mismas condiciones de amplificación usadas para diversos agentes infecciosos diferentes y llevando, de este modo, a la obtención de resultados más controlados y reproducibles. Además, pueden detectarse agentes infecciosos múltiples en una única muestra usando la metodología de amplificación múltiple descrita.

Las ventajas adicionales de la presente descripción incluyen la capacidad para automatizar el protocolo del procedimiento descrito, lo cual es importante para realizar ensayos rutinarios, especialmente en el laboratorio clínico.

Un ácido nucleico diana se hibrida con una sonda de amplificación circularizable. La sonda se diseña para que contenga secuencias genéricas (es decir, no específicas del ácido nucleico diana) y secuencias específicas complementarias de una secuencia de nucleótidos del ácido nucleico diana. Las secuencias específicas de la sonda son complementarias a regiones adyacentes del ácido nucleico diana y, de este modo, no solapan unas con las otras. Posteriormente, los extremos 3' y 5' de la sonda circularizable se unen usando un agente de ligamiento para formar una secuencia de amplificación ligada contigua. El agente de ligamento puede ser una enzima, por ejemplo, ADN ligasa, o un agente químico. Tras el lavado y retirada de los reactivos no unidos y de otros materiales de la muestra, la detección del ácido nucleico diana en la muestra original se determina mediante la detección de la secuencia de amplificación ligada. La secuencia de amplificación ligada (no el ácido nucleico diana) se amplifica para su detección.

En esta técnica no se amplifican las sondas no ligadas, ni tampoco el ácido nucleico diana. La sonda de amplificación es una única sonda de amplificación que se hibrida con la diana de modo que sus extremos 3' y 5' están yuxtapuestos. A continuación, los extremos se ligan mediante la ADN ligasa para formar una sonda circular unida covalentemente que puede identificarse mediante amplificación.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama esquemático que muestra diversos componentes usados para detectar un ácido nucleico diana, por ejemplo, el ARN del VHC, empleando dos sondas de captura/amplificación, que contienen cada una un resto de biotina unido y una única sonda de amplificación que se circulariza tras la hibridación con el ácido nucleico diana y el ligamiento de los extremos libres.

La Fig. 2 es una fotografía del ADN teñido con bromuro de etidio que muestra las sondas amplificadas por PCR usadas para detectar el ARN del VHC en una muestra. La cantidad de ARN del VHC en la muestra se determina comparando las densidades de las bandas de la muestra con las de diluciones seriadas de patrones de transcripciones del VHC.

La Fig. 3 es una fotografía del ADN teñido con bromuro de etidio que muestra las sondas amplificadas por PCR únicas de longitud completa dependientes de ligamiento y circularizables usadas para detectar el ARN de VHC en una muestra. La cantidad de ARN del VHC en la muestra se determina comparando las densidades de las bandas de la muestra con las de diluciones seriadas de patrones de transcripciones del VHC.

La Fig. 4 es un diagrama esquemático de una realización de RAM en la que se incorpora un promotor de T3 en el Cebador-ext 2, para permitir la amplificación de la sonda circular mediante transcripción.

La Fig. 5 proporciona un gel de poliacrilamida que muestra la amplificación de una sonda circular mediante la extensión del Cebador-ext 1.

La Fig. 6 es un diagrama esquemático de amplificación de una sonda circularizada mediante el procedimiento de amplificación por ramificación-extensión (RAM).

La Fig. 7 es un diagrama de un ensayo RAM en el que se incorpora en el cebador una secuencia promotora de la ARN polimerasa.

Descripción detallada de la invención

La presente descripción va dirigida a la simplificación de la preparación de muestra y a sistemas genéricos de amplificación de uso en ensayos clínicos para detectar y controlar los microorganismos patógenos en una muestra de ensayo, así como para detectar genes anómalos en un individuo. Los sistemas genéricos de amplificación se describen para un uso clínico que combina técnicas de ligamiento/amplificación con transcripción para detectar y medir ácidos nucleicos en una muestra. El presente procedimiento usa el procedimiento de amplificación por ramificación-extensión (RAM). Las ventajas del presente procedimiento incluyen (1) idoneidad en el ámbito del laboratorio clínico, (2) capa-

idad para obtener resultados controlados y coherentes (estandarizables), (3) capacidad para cuantificar ácidos nucleicos en una muestra en particular, (4) capacidad para detectar y cuantificar simultáneamente múltiples ácidos nucleicos diana en una muestra de ensayo, (5) capacidad para detectar de forma sensible y eficaz ácidos nucleicos en muestras de suero e *in situ* y (6) capacidad para detectar una mutación única en una diana. Además, el protocolo completo del procedimiento descrito actualmente puede automatizarse fácilmente, haciéndolo útil para los ensayos diagnósticos rutinarios en el ámbito del laboratorio clínico. Con el uso de RAM, puede lograrse una amplificación isotérmica.

El presente procedimiento incorpora la separación magnética, utilizando partículas, perlas o esferas paramagnéticas que se han recubierto con un resto ligando de unión que reconoce y se une al ligando presente en una sonda oligonucleotídica de captura, descrita a continuación, para aislar un ácido nucleico diana (ADN o ARN) a partir de una muestra clínica con el fin de facilitar su detección.

Las sondas pueden sintetizarse a partir de nucleósidos trifosfato mediante técnicas conocidas de síntesis automatizada de oligonucleótidos, por ejemplo, a través de la tecnología de fosforamidita convencional utilizando un sintetizador de ácidos nucleicos. Estos sintetizadores están disponibles, por ejemplo, en Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA).

Si las sondas van a ligarse conjuntamente, la siguiente etapa en el presente procedimiento implica tratar el complejo de la etapa (a) con un agente de ligamiento que unirá las dos sondas. El agente de ligamiento puede ser una enzima, por ejemplo, ADN o ARN ligasa, o un agente químico, por ejemplo, bromuro de cianógeno o una carbodiimida. Esto sirve para unir el extremo 5' con el extremo 3' de la sonda de amplificación circularizable para formar una molécula oligonucleotídica funcional de cadena sencilla contigua, denominada en este documento como secuencia de amplificación ligada. Ninguna de las sondas de amplificación que permanezca sin ligar después del tratamiento se amplificará en la etapas posteriores del procedimiento.

Las sondas pueden ligarse usando un agente de ligamiento adecuado, tal como una ADN o ARN ligasa. Alternativamente, el agente de ligamiento puede ser un agente químico, tal como bromuro de cianógeno o una carbodiimida (Skolova y col., FEBS Lett 232:153-155, 1988). Las ADN ligasas preferidas incluyen la ADN ligasa de T₄ y la ADN ligasa termoestable *Taq*. La ventaja de usar la ADN ligasa *Taq* es que ésta es activa a temperaturas elevadas (65-72°C). Si las sondas oligonucleotídicas se unen a estas temperaturas elevadas desciende el ligamiento inespecífico. Preferiblemente, la etapa de ligamiento se realiza durante 30-60 minutos a una temperatura elevada (aproximadamente 65-72°C), después de este tiempo, opcionalmente, cualquier sonda de amplificación no unida puede eliminarse en condiciones desnaturalizantes.

La desnaturalización se realiza tras la etapa de ligamiento añadiendo a la mezcla tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM). A continuación, la temperatura de la mezcla se eleva a aproximadamente 92-95°C durante aproximadamente 1-5 minutos para desnaturalizar el ácido nucleico hibridado. Este tratamiento separa el ácido nucleico diana de las secuencias de amplificación ligadas hibridadas.

Otra etapa en el procedimiento es la detección de la secuencia de amplificación ligada, lo que indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra de ensayo original.

Se usa un sistema de amplificación para amplificar la secuencia de amplificación ligada para su detección.

La sonda de amplificación se diseña de modo que las regiones complementarias de la sonda que hibridan con la secuencia del ácido nucleico diana se localizan en cada extremo de la sonda (como se describe en Nilsson y col., 1994, Science 265:2085-2088). Cuando la sonda hibrida con la diana, sus extremos se sitúan adyacentes entre sí, dando lugar a la formación de una molécula circular cerrada tras el ligamiento con un agente de ligamiento, tal como una enzima ligasa. A continuación, esta molécula circular puede servir como molde durante una etapa de amplificación, por ejemplo, usando cebadores tales como los mostrados en la Figura 1. La molécula circular se amplifica mediante RAM, como se describe a continuación en este documento.

Por ejemplo, la sonda descrita anteriormente, puede usarse para detectar genotipos diferentes de un patógeno, por ejemplo, genotipos diferentes del VHC en muestras de suero. Pueden diseñarse sondas específicas de genotipo, basándose en las secuencias del VHC publicadas (Stuyver y col., 1993, J. Gen. Virol. 74: 1093-1102), de modo que se detecta una mutación en el ácido nucleico diana puesto que esta mutación podría interferir con (1) la hibridación adecuada de la sonda del ácido nucleico diana y (2) ligamiento posterior de la sonda en una molécula circular. Debido a la naturaleza de la sonda circularizada, como se discute a continuación, pueden retirarse las sondas no ligadas en condiciones rigurosas de lavado.

La sonda única de longitud completa circularizable dependiente de ligamiento, como se utiliza en este procedimiento, permite una eficacia mayor en la detección y amplificación de la secuencia del ácido nucleico diana. Debido a la naturaleza helicoidal de las moléculas de ácido nucleico de doble cadena, las sondas circularizadas se enrollan alrededor de la cadena de ácido nucleico diana. Como resultado de la etapa de ligamiento, la sonda puede estar unida covalentemente a la molécula diana mediante encadenamiento. Esto da como resultado la inmovilización de la sonda en la molécula diana, formando una molécula híbrida que es sustancialmente resistente a las condiciones de lavado rigurosas. Esto da lugar a la reducción significativa de las señales no específicas durante el ensayo, menor ruido de fondo y un aumento de la especificidad del ensayo.

Otra realización de la presente descripción proporciona un procedimiento para reducir la contaminación de arrastre y el fondo en los procedimientos de amplificación que utilizan sondas circulares. Los presentes procedimientos de amplificación dependiente de ligamiento, al contrario que los procedimientos de amplificación convencionales, implican la amplificación de la sonda(s) ligada en lugar del ácido nucleico diana. Cuando la molécula ligada es una molécula circular cerrada, no tiene extremos libres susceptibles de digestión con exonucleasa. Tras el ligamiento de la sonda, es decir, circularización, el tratamiento de la mezcla de reacción con una exonucleasa proporciona una etapa de "limpieza" y, de este modo, reduce el fondo y la contaminación de arrastre mediante digestión de las sondas no ligadas o de los fragmentos de ADN lineal, pero no de las moléculas circulares cerradas. Las moléculas circulares unidas covalentemente permanecen intactas para la amplificación y detección posterior. En la PCR convencional, el uso de exonucleasa para eliminar cebadores de cadena sencilla o fragmentos de ADN de arrastre presenta el riesgo de que también se degradará el ácido nucleico diana. La presente invención no sufre este riesgo ya que no se amplifica el ácido nucleico diana. En una realización preferida, la exonucleasa es la exonucleasa III, exonucleasa VII, nucleasa de judía mungo o nucleasa BAL-31. La exonucleasa se añade a la reacción tras el ligamiento y antes de la amplificación, y se incuba, por ejemplo, a 37°C durante treinta minutos.

Además se contempla el uso de sondas múltiples que pueden ligarse para formar una única sonda circular cerrada covalentemente. Por ejemplo, se selecciona una primera sonda para hibridar con una región de la diana. Se selecciona una segunda sonda de modo que sus extremos 3' y 5' hibriden con regiones de la sonda que son adyacentes pero no solapan con los extremos 5' y 3' de la primera sonda. A continuación, se requieren dos sucesos de ligamiento para proporcionar una sonda circular cerrada covalentemente. Usando dos ligasas, por ejemplo, una ligasa enzimática y otra química, para unir covalentemente la sonda, puede controlarse el orden de los ligamientos. Esta realización es especialmente útil para identificar dos mutaciones próximas en una única diana.

La sonda circularizada también puede amplificarse y detectarse mediante la generación de un polímero grande. El polímero se genera mediante la extensión por el mecanismo del círculo rodante del cebador 1 a lo largo de la sonda circularizada y del desplazamiento de la secuencia en sentido 3'. Esta etapa produce un ADN de cadena sencilla que contiene unidades múltiples. Como se muestra en este documento, el cebador 2 puede unirse al polímero de ADN de cadena sencilla y extenderse simultáneamente, dando como resultado el desplazamiento de los cebadores en sentido 3' por cebadores en sentido 5'.

Según la presente descripción, usando una sonda circularizable dependiente de ligamiento, la molécula circular resultante pueden amplificarse convenientemente mediante el procedimiento de amplificación ramificación-extensión (RAM), como se muestra en la Figura 6. La amplificación de la sonda circularizada mediante RAM añade aún ventajas adicionales a los procedimientos de la presente invención permitiendo una amplificación de la sonda circularizada de hasta un millón de veces en condiciones isotérmicas. El RAM se ilustra en la Figura 6.

La sonda única de longitud completa circularizable dependiente de ligamiento útil para RAM contiene regiones en sus extremos 3' y 5' terminales que pueden hibridar con regiones adyacentes pero no contiguas de la molécula diana. La sonda circularizable se diseña para que contenga una región 5' que es complementaria y capaz de hibridar con una porción del ácido nucleico diana y una región 3' que es complementaria y capaz de hibridar con una porción del ácido nucleico diana adyacente a la porción de la diana que es complementaria a la región 5' de la sonda. Las regiones 5' y 3' de la sonda circularizable pueden tener cada una de aproximadamente 20 a aproximadamente 35 nucleótidos de longitud. En una realización preferida, las regiones 3' y 5' de la sonda circularizable tienen aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. La sonda circularizable además contiene una región denominada región enlazadora. En una realización preferida, la región enlazadora tiene de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. La región enlazadora está compuesta por una secuencia genérica que no es complementaria ni hibrida con la secuencia diana.

La sonda circularizable adecuada para la amplificación mediante RAM se utiliza en el presente procedimiento con una o más sondas de captura/amplificación, como se describe anteriormente en este documento. Cuando la sonda circularizable hibrida con el ácido nucleico diana, sus extremos terminales 5' y 3' se yuxtaponen. El ligamiento con una agente de ligamiento da lugar a la formación de una molécula circular cerrada.

La amplificación de la molécula circular cerrada se efectúa añadiendo un primer cebador de extensión (Cebador-ext 1) a la reacción. El Cebador-ext 1 es complementario y capaz de hibridar con una porción de la región enlazadora de la sonda circularizable y, preferiblemente, tiene de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. El Cebador-ext 1 se extiende añadiendo concentraciones suficientes de dNTP y una ADN polimerasa para extender el cebador alrededor de la molécula circular cerrada. Tras una vuelta al círculo, es decir, cuando la ADN polimerasa alcanza el sitio de unión del Cebador-ext 1, la polimerasa desplaza al cebador y a su secuencia extendida. De este modo, la polimerasa "gira" continuamente sobre la sonda circular cerrada para producir una única cadena larga de ADN, como se muestra en la Figura 6.

La polimerasa útil para la amplificación de la sonda circularizada mediante RAM puede ser cualquier polimerasa que carezca de actividad exonucleasa 3' - 5', que tenga actividad de desplazamiento de cadena y que sea capaz de la extensión de un cebador de al menos aproximadamente 1.000 bases. Las polimerasas preferidas son el fragmento (Exo-)Klenow de la ADN polimerasa, la ADN polimerasa de *Thermococcus litoralis* (ADN polimerasa Vento (exo⁻), New England Biolabs) y la polimerasa phi29 (Blanco y col., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:12198). También es útil según la presente invención la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq). En contra de publicaciones en la

bibliografía, según la presente invención, se ha encontrado que la ADN polimerasa *Taq* tiene actividad de desplazamiento de cadena.

La extensión del Cebador-ext 1 por la polimerasa da lugar a un ADN largo de cadena sencilla de unidades repetidas que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de la sonda circularizable. El ADN de cadena sencilla puede ser de hasta 10 Kb y puede contener, por ejemplo, de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 unidades, con cada unidad de longitud igual a la sonda circularizable, por ejemplo, de aproximadamente 100 bases. Como alternativa al RAM, la detección puede realizarse en esta etapa si la diana es abundante o el ADN de cadena sencilla es largo. Por ejemplo, puede detectarse el ADN largo de cadena sencilla en esta etapa visualizando el producto resultante como una molécula grande en un gel de poliacrilamida.

En la siguiente etapa de amplificación mediante RAM, se añade un segundo cebador de extensión (Cebador-ext 2). Preferiblemente, el Cebador-ext 2 tiene de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. El Cebador-ext 2 es idéntico a una porción de la región enlazadora que no se superpone con la porción de la región enlazadora a la que es complementario el Cebador-ext 1. Así, cada unidad de repetición del ADN largo de cadena sencilla contiene un sitio de unión con el que hibrida el Cebador-ext 2. De este modo, se unen múltiples copias del Cebador-ext 2 al ADN largo de cadena sencilla, como se muestra en la Figura 6 y se extienden con la ADN polimerasa. Los productos de extensión del cebador desplazan a los cebadores en sentido 3' con sus correspondientes productos de extensión para producir moléculas de ADN de cadena sencilla de desplazamiento múltiple, como se muestra en la Figura 6. Las cadenas sencillas desplazadas contienen sitios de unión para el Cebador ext-1 y sirven, de este modo, como moldes de reacciones adicionales de extensión del cebador para producir la molécula de ramificación múltiple mostrada en la Figura 6. la reacción finaliza cuando todas las moléculas de ADN se convierten en moléculas de doble cadena.

Entonces, el ADN amplificado por RAM se detecta mediante procedimientos conocidos en la técnica para detección del ADN. Debido a que RAM da lugar a una amplificación exponencial, las grandes cantidades de ADN resultantes pueden detectarse convenientemente, por ejemplo, mediante gel de electroforesis y visualizarse, por ejemplo, con bromuro de etidio. Debido a que los productos de extensión de RAM difieren en tamaño dependiendo del número de unidades extendidas a partir del ADN circular cerrado, los productos RAM aparecen como una cola de degradación y escalonado cuando se someten a electroforesis. En otra realización, la sonda circularizable se diseña para que contenga un sitio de restricción único y los productos RAM se digieren con la correspondiente endonucleasa de restricción para proporcionar una cantidad mayor de un fragmento de tamaño único de una unidad de longitud, es decir, la longitud de la sonda circularizable. El fragmento puede detectarse fácilmente por electroforesis en gel como una única banda. Alternativamente, puede incorporarse un ligando, tal como biotina o digoxigenina, durante la extensión del cebador y puede detectarse el producto de cadena sencilla marcado con el ligando, como se describe en este documento a continuación.

Los productos de extensión de RAM pueden detectarse por otros procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, ELISA.

El Cebador-ext 2 (y de este modo la porción idéntica de la región enlazadora de la sonda circularizable) se diseña para que contenga una secuencia promotora para una ARN polimerasa dependiente de ADN. En la técnica se conocen ARN polimerasas y las correspondientes secuencias promotoras y se describen, por ejemplo, en Milligan y col. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:8783. En una realización preferida, la ARN polimerasa es la polimerasa del bacteriófago T3, T7 o SP6. La adición del Cebador-ext 2 que contiene la secuencia promotora, la ARN polimerasa y los rNTP correspondientes, permiten la hibridación del Cebador-ext 2 con el ADN de cadena sencilla creciente para formar un promotor funcional y la transcripción de múltiples copias de ARN de la secuencia en sentido 3'. Esta realización de la invención se ilustra en la Figura 4. En esta realización, tanto RAM como la transcripción funcionan para producir una amplificación significativa de la sonda. El ARN puede detectarse mediante procedimientos conocidos por un experto en la materia, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida, marcaje radiactivo o no radiactivo y procedimientos de detección (Boehringer Mannheim) o el ensayo de detección de Sharp (Digene, Md.). La detección del ARN indica la presencia del ácido nucleico diana.

En otra realización, el Cebador-ext 1 y la parte correspondiente de la región enlazadora de la sonda circular se diseñan para que tengan una secuencia promotora de la ARN polimerasa dependiente de ADN incorporada en éstos. De este modo, cuando el Cebador-ext 1 se une a la sonda circularizada, se forma un promotor funcional y la sonda circularizada actúa como molde para la transcripción de ARN tras la adición de la ARN polimerasa y de los rNTP. El cebador en sentido 3' y su secuencia de ARN son desplazados por la ARN polimerasa y puede hacerse un polímero de ARN grande. El polímero de ARN puede detectarse como se describe anteriormente en este documento. Alternativamente, la sonda circular puede escindir en un ADN de cadena sencilla añadiendo una enzima de restricción, tal como EcoRI. El sitio de restricción se incorpora al extremo 5' del cebador de extensión 1, como se muestra en la Figura 7.

Los reactivos para su uso en la práctica de la presente descripción pueden proporcionarse individualmente o pueden envasarse en forma de kit. Pueden incluirse los reactivos requeridos para el ligamiento (por ejemplo, la ADN ligasa) y, posiblemente, para la amplificación. También pueden incluirse reactivos adicionales para su uso en la detección cuantitativa de la secuencia de amplificación ligada amplificada, por ejemplo, moldes control, tales como un oligodeoxirribonucleótido que se corresponde con ARN nanovariante. Adicionalmente, los kits pueden incluir reactivos para

ES 2 273 371 T3

la detección *in situ* de secuencias de ácido nucleico diana, por ejemplo, en muestras de tejido. Los kits que contienen sondas circulares pueden también incluir exonucleasa para la prevención del arrastre.

La distribución de los reactivos dentro de los recipientes del kit dependerá de los reactivos específicos implicados. Cada reactivo puede envasarse en un recipiente individual pero también pueden ser posibles diversas combinaciones.

La presente descripción se ilustra con los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la descripción.

Ejemplo 1

Uso de sondas de captura y amplificación múltiples para detectar el ARN del VHC en una muestra

Se usaron un par de sondas de amplificación y dos sondas de captura/amplificación para ensayar y detectar el ARN del VHC en una muestra, incrementando, así, la eficacia de captura del ensayo.

Se diseñaron y sintetizaron las sondas de captura/amplificación, la Sonda-captura/amp-1 (VHC A) (todos los oligómeros descritos en este Ejemplo se denominan “(VHC A)”), con la ID SEC N° 22 y la Sonda-captura/amp-1A (VHC A) con la ID SEC N° 23, de modo que sus extremos 5’ están biotinilados y la región 3’ de las sondas comprende secuencias complementarias y que pueden hibridar con la secuencia de la UTR 5’ del ARN del VHC. Las secuencias genéricas de nucleótidos en la región 5’ de las sondas que no hibridan con la secuencia de ácido nucleico diana se diseñan y sintetizan para tener secuencias aleatorias y un contenido en GC de, al menos, el 60% y exhiben de este modo una estructura secundaria mínima, por ejemplo, estructuras en horquilla o autohibridables.

La Sonda-captura/amp-1 (VHC A), que está biotinilada en el extremo 5’, es un oligómero de ADN de 45 nucleótidos, de modo que los nucleótidos 5 a 45 en la región 3’ son complementarios y pueden hibridar con secuencias de la UTR 5’ del ARN del VHC diana, y el oligómero tiene la siguiente secuencia nucleotídica (también enumerada a continuación como ID SEC N° 22):

5’ - AAGAGCGTGA AGACAGTAGT TCCTCACAGG GGAGTGATTC ATGGT - 3’

La Sonda-captura/amp-1A (VHC A), que también está biotinilada en el extremo 5’, también es un oligómero de ADN de 45 nucleótidos, de modo que los nucleótidos 5 a 45 en la región 3’ son complementarios y pueden hibridar con secuencias de la UTR 5’ del ARN del VHC que están inmediatamente adyacentes a la región de la UTR 5’ del ARN del VHC que hibrida con la Sonda-captura/amp-1 (VHC A) y de modo que el oligómero tiene la siguiente secuencia nucleotídica (también enumerada a continuación como ID SEC N° 23):

5’ - AAGACCCAAC ACTACTCGGC TAGCAGTCTT GCGGGGGCACGCCCA - 3’

Cada una de las dos sondas de amplificación, Sonda- amp-2 (VHC A) y Sonda-amp-2A (VHC A), contienen una secuencia de nucleótidos complementaria y que puede hibridar con la UTR 5’ conservada del ARN del VHC.

La Sonda-amp-2 (VHC A) es un oligómero de 51 nucleótidos, de modo que los nucleótidos 1 a 30 en la región 5’ son complementarios y pueden hibridar con secuencias de la UTR 5’ del ARN del VHC y los nucleótidos 34 a 51 en el extremo 3’ se unen e hibridan con el cebador-3 para PCR y de modo que el oligómero tiene la siguiente secuencia nucleotídica (también enumerada a continuación como ID SEC N° 24):

5’ - ACTCACCGGT TCCGACAGACC ACTATGGCTC GTTGTCTGTG TATCTGCTAA C - 3’

La Sonda-amp-2A (VHC A) es un oligómero de 69 nucleótidos, de modo que los nucleótidos 40 a 69 en la región 3’ son complementarios y pueden hibridar con secuencias de la UTR 5’ del ARN genómico del VHC inmediatamente adyacente a la porción del ARN genómico del VHC que puede hibridar con los nucleótidos 1-30 de la Sonda-amp-2 (VHC A) y de modo que los nucleótidos 1 a 18 en el extremo 5’ se unen e hibridan con el cebador-4 para PCR y de modo que los nucleótidos 19 a 36 del extremo 5’ se unen e hibridan con el cebador-5 para PCR, y de modo que el oligómero tiene la siguiente secuencia nucleotídica (enumerada también a continuación como ID SEC N° 25):

5’ - CAAGAGCAAC TACACGAATT CTCGATTAGG TTA CTGCAGA GGACCCGGTC GTCCTGG CAA TTCCGGTGT - 3’

El ligamiento extremo con extremo de las dos sondas proporciona un producto ligado de 120 nucleótidos, la secuencia de ligamiento-amplificación (VHC A) que sirve como una secuencia detectable para el VHC, así como de molde para las reacciones de amplificación, y tiene la secuencia (enumerada también como ID SEC N° 26):

5’ - CAAGAGCAAC TACACGAATT CTCGATTAGG TTA CTGCAGA GGACCCGGTC GTCCTGG CAA TTCCGGTGTGTA CTCACCGGTT CCGCAGACCA CTATGGCTCG TTGTCTGTGT ATCTGCTA AC - 3’

El cebador-3, usado para la primera serie de amplificación por PCR de la secuencia de amplificación ligada, ID SEC N° 26 (VHC A) y que tiene una longitud de 18 nucleótidos, es complementario a la secuencia que comprende

los nucleótidos 34 a 51 en el extremo 3' de la Sonda-amp-2 (VHC A) y, por tanto, también es complementario a la secuencia que comprende los nucleótidos 103 a 120 de la secuencia de amplificación ligada, ID SEC N° 26 (VHC A) y tiene la secuencia (enumerada también a continuación como ID SEC N° 27):

5' - GTTAGCAGAT ACACAGAC - 3'

El cebador-4, usado para la primera serie de amplificación por PCR de la secuencia de amplificación ligada (VHC A), ID SEC N° 26 y que tiene una longitud de 18 nucleótidos, es complementario a la secuencia que comprende los nucleótidos 1-18 en el extremo 5' de la Sonda-amp-2A (VHC A) y, por tanto, también es complementario a la secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 18 de la secuencia de amplificación ligada, ID SEC N° 26 (VHC A) y tiene la secuencia (enumerada también a continuación como ID SEC N° 28):

5' - CAAGAGCAAC TACACGAA - 3'

El cebador-5, un oligómero de ADN de 18 nucleótidos, se usa para la segunda serie de amplificación por PCR de la secuencia de amplificación ligada (VHC A), ID SEC N° 26, de modo que el cebador es complementario a la secuencia que comprende los nucleótidos 19-36 de la Sonda-amp-2A (VHC A) y, por tanto, también puede hibridar con la secuencia que comprende los nucleótidos 19-36 de la secuencia de amplificación ligada, ID SEC N° 26 (VHC A) y tiene la secuencia (enumerada también a continuación como ID SEC N° 29):

5' - TTCTCGATTA GGTACTG - 3'

El ensayo que utiliza las sondas y cebadores anteriores se usó para detectar el ARN del VHC en 24 muestras de suero humano que se conservaron a -70°C hasta su uso. Para el ensayo se añadieron 180 µl de muestra de suero a un tampón de lisis concentrado (preparado mediante la condensación de 250 µl de la solución de lisis que contenía GnSCN 5 M, albúmina de suero bovino al 0,5%, EDTA 80 mM, Tris HCl 400 mM (pH 7,5) y Nonidet P-40 al 0,5%, de modo que la mezcla de suero y tampón de lisis tendría una concentración final de GnSCN 5 M), se mezcló bien y se incubó durante 1 hora a 37°C para liberar el ARN diana de las partículas de VHC. Se transfirieron, a continuación, 80 µl de la mezcla de lisis a 120 µl de tampón de hibridación [albúmina de suero bovino al 0,5%, EDTA 80 mM, Tris HCl 400 mM (pH 7,5), Nonidet P-40 al 0,5%] con 10¹⁰ moléculas de cada una de las sondas de amplificación, oligómeros de la Sonda-amp-2 (VHC A) y de la Sonda-amp-2A (VHC A), y 10¹¹ moléculas de cada una de las sondas de captura/amplificación, Sonda-captura/amp-1 (VHC A) y Sonda-captura/amp-1A (VHC A). La adición del tampón de hibridación reducía la concentración de isotiocianato de guanidina (GnSCN) de 5 M a 2 M para permitir que se produjera la hibridación. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora para dejar que hibridaran las diversas sondas con el ARN diana, después de lo cual se añadieron a la mezcla de hibridación 30 µl de perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina (Promega) antes de la incubación a 37°C durante 20 minutos para permitir la unión del ligando. A continuación, se lavaron las perlas con 150 µl de GnSCN 2 M para eliminar cualquier sonda libre, proteínas, ácidos nucleicos extraños y posibles inhibidores de PCR de la mezcla de hibridación; esto se llevó a cabo mediante la eliminación del GnSCN lavando dos veces con 150 µl de tampón de ligasa [Tris HCl 66 mM (pH 7,5), DTT 1 mM, ATP 1 mM, Nonidet P-40 al 0,5% y MnCl₂ 1 mM]. En cada etapa de lavado, se efectuó una separación magnética del complejo unido a partir del sobrenadante.

Las sondas de amplificación, la Sonda-amp-2 (VHC A) y la Sonda-amp-2A (VHC A), unidas al ARN diana se unían entonces covalentemente para crear la secuencia de amplificación ligada (VHC A) que se utilizaba como molde para la amplificación por PCR. El complejo híbrido se resuspendió en 20 µl de tampón de ligasa con 5 unidades de ADN ligasa de T4 (Boehringer) y se incubó durante 1 hora a 37°C para la reacción de ligamiento. Para la posterior reacción de PCR, referida de aquí en adelante como la "primera reacción de PCR", se añadieron 10 µl de la mezcla de ligamiento, que incluía las perlas, a 20 µl de la mezcla de PCR [0,06 µM de cada cebador, cebador-3 y cebador-4, 1,5 unidades de ADN polimerasa *Taq*, 0,2 mM de cada dNTP, dATP, dCTP, dGTP y dTTP, MgCl₂ 1,5 mM, Tris HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM] y la mezcla se incubó a 95°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 72°C durante 1 minuto, durante 35 ciclos. Después de la primera reacción de PCR, se transfirieron 5 µl del producto a una segunda mezcla de PCR [los mismos componentes que la primera mezcla de PCR excepto porque el cebador-4 se sustituyó por el cebador-5] para la "segunda reacción de PCR" (una aproximación de PCR semianidada para aumentar la sensibilidad del ensayo) realizada en las mismas condiciones que la primera reacción de PCR. Se sometieron a electroforesis 10 µl de los productos de la segunda reacción en un gel de poliácridamida al 6%, se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó con luz ultravioleta.

Para establecer la sensibilidad y especificidad del procedimiento, se ensayaron diluciones seriadas 1:10 de ARN sintético del VHC en sueros negativos para VHC, según el protocolo descrito anteriormente, de modo que la concentración de ARN del VHC oscilaba de 10 a 10⁷ moléculas/reacción. Tras el ligamiento y amplificación, los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de poliácridamida, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz ultravioleta. Los resultados, mostrados en la Figura 2 indican claramente la especificidad del procedimiento. En ausencia de ARN del VHC no hay señal, lo que indica que las sondas deben capturar el ARN diana para generar un producto de PCR. Se puede detectar una cantidad tan pequeña como 100 moléculas de ARN del VHC/muestra con el procedimiento de PCR semianidada (Figura 2), lo que indica que la sensibilidad del procedimiento es al menos comparable a la de la RT-PCR convencional (Clementi y col., 1993, PCR 2: 191-196).

Además, las cantidades relativas del producto de PCR representadas por la intensidad de las bandas como se visualiza en la Figura 2, eran proporcionales a la cantidad de ARN diana (transcritos de ARN del VHC). Por tanto, el ensayo es cuantitativo sobre, al menos, un intervalo de 10^2 a 10^5 moléculas diana.

Para determinar el aumento de la eficacia de la captura proporcionada por las dos sondas de captura, se ensayó la captura y retención de ARN del VHC marcado con ^{32}P en las perlas paramagnéticas usando la Sonda-captura/amp-1 (VHC A) o la Sonda-captura/amp-1A (VHC A) o ambas. La captura se estimó mediante la cantidad de radioactividad retenida en las perlas paramagnéticas tras exhaustivos lavados con tampón GnSCN 2 M y el tampón de ligasa. Los resultados mostraron que el 25,7% del ARN del VHC marcado quedaba retenido en las perlas cuando se capturaba mediante la Sonda-captura/amp-1 (VHC A) sola, el 35,8% retenido con la Sonda-captura/amp-1A (VHC A) sola y el 41,5% del ARN diana quedó retenido cuando se usaban ambas sondas de captura. Por tanto, el procedimiento de captura doble es más eficaz que el uso de una única sonda de captura.

Ejemplo 2

Uso de sondas de captura/amplificación independientes y una única sonda amplificable dependiente de ligamiento para detectar el ARN del VHC en una muestra

El procedimiento en este Ejemplo emplea las dos sondas de captura/amplificación, Sonda-captura/amp-1 (VHC A) y Sonda-captura/amp-1A (VHC A), descritas en el Ejemplo comparativo 1 y una única sonda de amplificación, Sonda-amp-2 (VHC C) (todos los oligómeros descritos en este Ejemplo se denominan “(VHC C)”) que hibrida con el ácido nucleico diana y se circulariza tras el ligamiento de sus extremos libres como se muestra en la Figura 1.

La Sonda-amp-2 (VHC C) es una sonda de amplificación de 108 nucleótidos, también denominada como secuencia de amplificación, de modo que los nucleótidos 1-26 en el extremo 5' del oligómero son complementarios y pueden hibridar con una secuencia en la UTR 5' del ARN del VHC diana (indicado por (a) en la Figura 1) y de modo que los nucleótidos 83-108 en el extremo 3' del oligómero son complementarios y pueden hibridar con una secuencia en la UTR 5' del ARN del VHC diana (indicado por (b) en la Figura 1). Además, cuando la sonda hibrida con el ARN del VHC diana, los extremos 3' y 5' de la sonda se colocan inmediatamente adyacentes el uno del otro (Figura 1), dando como resultado la formación de una molécula circular cerrada tras el ligamiento con un agente de ligamiento, tal como ADN ligasa. A continuación se da la secuencia de la sonda-Amp2 (VHC-C) (también enumerada como la ID SEC N° 31).

5' - CCTTTCGCGA CCCAACACTA CTCGGCTGTC TGTGTATCTG CTAACCAAGA GCAACTACAC
GAATTCTCGA TTAGGTTACT GCGCACCCTA TCAGGCAGTA CCACAAGG - 3'

El cebador-3 (ID SEC N° 27), usado para la primera serie de amplificación por PCR de la Sonda-amp-2 (VHC C) ligada y circularizada, es un oligómero de 18 nucleótidos de longitud que es complementario a la secuencia que comprende los nucleótidos 27 a 45 de la Sonda-amp-2 (VHC C).

El cebador-4 (ID SEC N° 28), usado también para la primera serie de amplificación por PCR de la Sonda-amp-2 ligada y circularizada, es un oligómero de 18 nucleótidos de longitud que es complementario a la secuencia que comprende los nucleótidos 46 a 63 de la Sonda-amp-2 (VHC C).

La hibridación de las dos sondas de captura/amplificación y de la sonda de amplificación con el ARN del VHC diana, la circularización de la sonda de amplificación tras el ligamiento de sus extremos y la amplificación de las secuencias de las sondas se realizó como se describe en el Ejemplo 1, excepto porque sólo se utilizaron los cebadores 3 y 4 en una única etapa de amplificación por PCR, se omitió la segunda etapa de amplificación por PCR y porque el par de sondas de amplificación, Sonda-amp-2 (VHC A) (ID SEC N° 24) y Sonda-amp-2A (VHC A) (ID SEC N° 25) utilizadas en el Ejemplo 5, sustituyeron la Sonda-amp-2 (VHC C) (ID SEC N° 31).

Para establecer la sensibilidad y especificidad del procedimiento, se ensayaron diluciones seriadas 1:10 del ARN sintético del VHC en sueros negativos para VHC, según el procedimiento para proporcionar concentraciones estándares de ARN del VHC que oscilaban de 10^3 a 10^7 moléculas/muestra. Tras el ligamiento y amplificación, los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz ultravioleta.

Los resultados, (Figura 3, (-): control, sin muestra), indican la especificidad del procedimiento. El ensayo es muy específico; en ausencia del ARN del VHC no hay señal visible, lo que indica que las sondas deben capturar el ARN diana para generar un producto de PCR. Como se observa en la Figura 3, pueden detectarse claramente un mínimo de 10^4 moléculas de ARN del VHC/muestra.

Además, las cantidades relativas del producto de PCR, representadas por la intensidad de las bandas (Figura 3), eran proporcionales a la cantidad de ARN diana (transcritos del ARN del VHC). Por tanto, el ensayo es significativamente cuantitativo, al menos sobre un intervalo de 10^4 a 10^7 moléculas diana.

ES 2 273 371 T3

Ejemplo 3

Desplazamiento del cebador de extensión sobre la secuencia de amplificación circular

- 5 Este ejemplo demuestra la capacidad del fragmento Klenow de la ADN polimerasa para desplazarse por las cadenas en sentido 3' y producir un polímero.

Se detectó un ADN sintético diana mezclando 10^{12} moléculas de la sonda circularizable fosforilada que tiene la ID SEC N° 31 con 10^{13} moléculas del ADN sintético del VHC diana en 10 μ l de tampón de ligamiento 1X, calentando a 65°C durante dos minutos y enfriando a temperatura ambiente durante diez minutos. Se añadió 1 μ l de ligasa a la mezcla y se incubó a 37°C durante una hora, seguido por la adición de 10^{13} moléculas de Cebador-ext marcado con 32 P que tiene la ID SEC N° 27. La mezcla se calentó a 100°C durante cinco minutos y, a continuación, se enfrió a temperatura ambiente durante veinte minutos. Se añadieron 40 μ l de la mezcla Klenow y dNTP a la reacción y se incubó a 37°C. Se retiraron alícuotas de 10 μ l a las 0, 1, 2 y 3 horas y se examinaron en un gel de poliacrilamida al 8%. Los resultados se muestran en la Figura 5. Los carriles de la izquierda muestran los resultados en ausencia de ligasa. Los carriles de la derecha muestran la extensión después del ligamiento. Las bandas que oscilaban de 105 a 600 bases pueden visualizarse en los carriles de la derecha. Los resultados demuestran que el fragmento Klenow es capaz de realizar la extensión a partir del Cebador-ext, desplazándose en la cadena en sentido 3' y generando polímeros.

Ejemplo 4

- 25 *Detección del ARN temprano de EBV (EBER-1) en adenomas pleomórficos parotídeos mediante PCR dependiente de ligamiento*

Se realizó una LD-PCR utilizando una sonda circularizada para detectar el ARN temprano del virus de Epstein Barr (EBER-1) en tumores mixtos benignos (TMB) de las glándulas salivares. Seis muestras de TMB y de tejido parotídeo adyacente y tres muestras de tejido parotídeo normal (dos extraídas de quistes y una de un ganglio linfático hiperplásico) se congelaron rápidamente en medio de inclusión para muestras de tejido congelado (OCT, Miles, Inc., Elkhart, In.) y en nitrógeno líquido y se conservaron a -70°C. Se obtuvieron los correspondientes bloques de tejido fijado en formalina e incluido en parafina (FFIP) y se estudiaron en paralelo junto con el tejido fresco. Todos los tejidos se cortaron en un microtomo, y las cuchillas se limpiaron con Chlorox al 10% entre cada caso para evitar la contaminación cruzada. Dos de los tres cortes de cada muestra se colocaron en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. Los tejidos FFIP se desparafinaron mediante la incubación a 60°C durante 10 minutos con 1 ml de xileno (Sigma), que se eliminó posteriormente mediante dos lavados con etanol absoluto. Estas muestras se secaron colocándolas en una placa caliente a 65°C durante 30 minutos. El tejido desparafinado se lisó por incubación a 100°C durante 30 minutos y después a 65°C durante 30 minutos en 250 μ l de tampón de lisis: tiocianato de guanidina 5 M (GTC) (Fluka), albúmina de suero bovino al 0,5% (Sigma), EDTA 80 mM, Tris HCl 400 mM (pH 7,5) y sal sódica de N-laurilsarcosina al 0,5% (Sigma). El tejido congelado fresco se lisó mediante la incubación a 37°C durante 60 minutos en el mismo tampón de lisis. Las muestras lisadas se conservaron a -20°C hasta su uso.

Para capturar el ARN diana se usaron dos sondas de captura/amplificación diseñadas para flanquear los extremos de la región de EBER-1. La secuencia para la sonda de captura 1 (ID SEC N° 40) y la sonda de captura/amplificación 2 (ID SEC N° 41) se muestran en la Tabla 4. La sonda de amplificación circular (ID SEC N° 42) se diseñó con regiones 3' y 5' complementarias a la secuencia diana elegida (Tabla 4). Interpuesta entre estas dos regiones hay una secuencia enlazadora no complementaria. Esta sonda de amplificación circular se circularizaba tras la hibridación con la diana de tal manera que se yuxtaponen los extremos 5' y 3'. La PCR semianidada se realizó usando los pares de cebadores dirigidos a esta secuencia enlazadora, mostrada también en la Tabla 4.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 4

Secuencias de las sondas de captura, sonda diana circular amplificable y cebadores para PCR

EBER-Cap/Amp-1	5'Biotina-AAGAgctctcctccctagcaaaacctctagggcagcgtaggctctg-3'	(ID SEC N° 40)
EBER-Cap/Amp-2	5'Biotina AAGAggatcaaaacatgctggaccaccagctggtacttgaccgaag-3'	(ID SEC N° 41)
SONDA Amp circular	5'tcaccacccgggactgtaccggggacTGTCTGTGTATCTGCTAACCAAGA GCAACTACACGAATTCTCGATTAGGTTACTGCggaagacaaccacag acaccgttcc-3'	(ID SEC N° 42)
1ª PCR	GTTAGCAGATACACAGAC	(sentido ID SEC N° 27)
pares de cebadores:	CAAGAGCAACTACACGAA	(complementario ID SEC N° 28)
2ª PCR	GTTAGCAGATACACAGAC	(sentido ID SEC N° 27)
pares de cebadores:	TTCTCGATTAGGTTACTG	(complementario ID SEC N° 29)

(minúsculas: complementaria a EBER-1, mayúsculas: diseñado genéricamente)

La LD-PCR se realizó como sigue. Brevemente, se añadieron 80 μ l de la mezcla de lisis a 120 μ l de tampón de hibridación (albúmina de suero bovino al 0,5%, EDTA 80 mM, Tris-HCl 400 mM (pH 7,5) y sal sódica de N-laurilsarcosina (Sigma) al 0,5% con 10^{10} moléculas de sonda diana fosforilada y 10^{11} moléculas de sonda de captura 1 y sonda de captura 2. La adición del tampón de hibridación reducía la concentración de GnSCN de 5 M a 2 M para permitir que se produjera la hibridación. Esta mezcla se incubó durante una hora para permitir la formación de híbridos, compuestos de las dos sondas de captura/amplificación de ADN y una sonda de amplificación circular de ADN hibridados en el ARN diana. Se añadieron a la mezcla 30 μ l de perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina (Promega) y se incubó a 37°C durante 20 minutos para permitir que los híbridos se unieran a la superficie de las perlas. Las perlas se lavaron dos veces con 150 μ l de tampón de lavado (Tris HCl 10 mM (pH 7,5), Nonidet P-40 al 0,5%, MgCl₂ 1,5 mM y KCl 50 mM) para eliminar las sondas no hibridadas, así como los posibles inhibidores de la PCR (GTC, proteínas) y posibles fuentes de productos de PCR no específicos (ácidos nucleicos celulares). Durante cada lavado, las perlas se quedaban pegadas a la pared del tubo colocando el tubo en un soporte magnético para separación (Promega), lo que permitía eliminar el sobrenadante mediante aspiración. Los extremos 3' y 5' de las sondas de amplificación circulares que hibridaban directamente adyacentes una a la otra en el ARN diana, se unieron covalentemente y, por lo tanto, se circularizaron mediante incubación a 37°C durante 1 hora con 20 μ l de solución de ligasa (Tris HCl 66 mM (pH 7,5), ditiotretitol 1 mM, ATP 1 mM, MnCl₂ 1 mM y 5 unidades de ADN ligasa de T4 (Boehringer)). Se transfirieron 10 μ l de la mezcla de reacción de ligamiento, incluyendo perlas paramagnéticas, a 20 μ l de una mezcla de PCR que contenía 0,66 μ M del cebador para PCR, 0,5 unidades de ADN polimerasa Taq, dATP 0,2 mM, dCTP 0,2 mM, dGTP 0,2 mM, dTTP 0,2 mM, Mg₂ 1,5 mM y Tris-HCl 10 mM (pH 8,3) y KCl 50 mM. La primera mezcla de reacción de PCR se incubó a 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 72°C durante 1 minuto por 35 ciclos en un termociclador GeneAmp PCR sistema 9600 (Perkin Elmer, CT). Después de la primera PCR, se transfirieron 5 μ l de cada mezcla de reacción a 25 μ l de una segunda mezcla de reacción que contenía los mismos componentes excepto que se usaron 0,66 μ M del cebador 1 de PCR y 0,66 μ M del cebador 3 de PCR para la PCR semianidada, que aumenta la sensibilidad de la señal de detección sin comprometer la especificidad de la amplificación. La extensión del cebador para PCR a lo largo de la sonda circularizada covalentemente da lugar a la generación de un gran polímero multiunidad (polimerización por círculo rodante). De hecho, sin la digestión de las unidades monoméricas, el polímero producto de la PCR no puede migrar en el gel de poliacrilamida. Se digirieron 10 μ l de la segunda reacción de PCR con la enzima de restricción EcoRI en presencia de NaCl 50 mM, Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM, Triton X-100 al 0,025% y se analizaron mediante electroforesis en gel a través de un gel de poliacrilamida al 6% y se visualizó mediante fluorescencia ultravioleta después de teñir con bromuro de etidio. La presencia de una banda de 90 pares de bases (producto de la segunda PCR) y un producto de 108 pares de bases (1ª PCR) se consideró como un resultado positivo. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

TABLA 5

ARN temprano de EBV (EBER-1) detectado por LD-PCR

Caso	Tejido parotídeo (congelado)	Adenoma pleomórfico (congelado)	FFIP
1	positivo	nada	positivo
2	negativo	nada	negativo
3	negativo	nada	ND
4	ND	positivo	negativo
5	positivo	positivo	negativo
6	positivo	positivo	positivo
7	positivo	negativo	negativo
8	positivo	positivo	negativo
9	positivo	negativo	negativo

Nota - Los casos 1 y 2 eran de tejidos parotídeos extraídos por razones distintas al adenoma pleomórfico.

Los casos 3-8 contenían adenoma pleomórfico.

FFIP - tejido fijado en formalina e incluido en parafina. Congelado - tejido congelado rápidamente en nitrógeno líquido.

ND - no determinado por falta de tejido disponible.

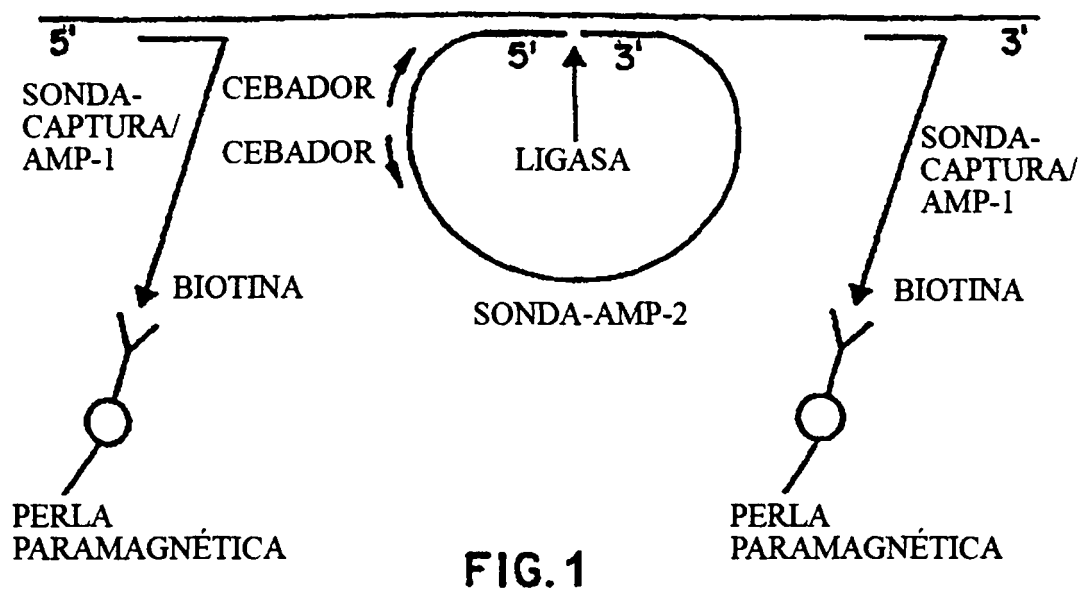
En resumen, las secuencias EBER-1 se detectaron en seis de las ocho muestras parotídeas. De los seis adenomas pleomórficos estudiados, cuatro eran positivos para EBER-1. En los dos casos en los que no se detectó EBER en el tumor, las secuencias estaban presentes en el tejido parotídeo circundante. La detección de las secuencias EBER-1 en el correspondiente tejido fijado en formalina e incluido en parafina era considerablemente menos sensible (sólo dos de las ocho muestras eran positivas).

En resumen, los presentes resultados con PCR dependiente de ligamiento que utiliza una sonda circular demuestran la presencia de secuencias relacionadas con EBV en la mayoría de los adenomas pleomórficos estudiados. El presente procedimiento muestra una tasa de detección notablemente aumentada con respecto a la PCR convencional para la detección del ADN del EBV como realizaron Taira y col. (1992) *J. of Otorhinolaryngol. Soc. Jap.* 95: 860. En el presente procedimiento, los extremos 3' y 5' de una sonda circularizable hibridaba con la secuencia diana, dando lugar a la yuxtaposición. A continuación, las secuencias yuxtapuestas se ligaban dando lugar a una sonda circularizada ligada covalentemente que quedaba inmovilizada en la secuencia diana y siendo, de este modo, resistente a lavados rigurosos. La PCR de la sonda circular producía un polímero por círculo rodante que se digería en unidades monoméricas y se visualizaba en un gel. El uso de la PCR dependiente de ligamiento con una sonda circular, seguido por la detección mediante amplificación de la sonda por círculo rodante, daba lugar a una tremenda sensibilidad en la detección de la diana en el tejido congelado fresco.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar un ácido nucleico diana en una muestra que comprende:

- 5 (a) poner en contacto el ácido nucleico de la muestra en las condiciones que permitan la hibridación del ácido nucleico entre secuencias complementarias en los ácidos nucleicos con sondas oligonucleotídicas, comprendiendo las sondas oligonucleotídicas además una sonda de amplificación circularizable con regiones 3' y 5' que son complementarias a secuencias adyacentes pero no solapantes en el ácido nucleico diana, estando separadas dichas regiones 3' y 10 5' por una región genérica que no es ni complementaria ni puede hibridar con una secuencia nucleotídica en el ácido nucleico diana, de modo que se forma un complejo que comprende el ácido nucleico diana y la sonda circularizable, en el que la sonda circularizable está unida en sus extremos 3' y 5' a secuencias adyacentes pero no solapantes en el ácido nucleico diana;
- 15 (b) separar el complejo de los reactivos no unidos y lavar el complejo;
- (c) ligar los extremos 3' y 5' de la sonda circularizable con un agente de ligamiento que une las secuencias nucleotídicas, de modo que se forma una sonda de amplificación circular;
- 20 (d) amplificar la sonda de amplificación circular poniendo en contacto el complejo con un primer cebador de extensión que es complementario y puede hibridar con la porción genérica de la sonda de amplificación circular y con un segundo cebador de extensión que es sustancialmente idéntico a la porción genérica de la sonda de amplificación circular que no solapa con la porción de la región genérica a la cual se une el primer cebador de extensión, dNTP y una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena en condiciones en las que el primer cebador de 25 extensión se extiende alrededor de la sonda circular durante múltiples vueltas para formar un ADN de cadena sencilla de unidades repetitivas complementario a la secuencia de la sonda circular, copias múltiples del segundo cebador de extensión que hibridan con regiones complementarias del ADN de cadena sencilla y que se extienden mediante la ADN polimerasa para proporcionar productos de extensión, y
- 30 (e) detectar el ácido nucleico amplificado, en el que la detección del mismo indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra, **caracterizado** porque el segundo cebador de extensión además contiene una secuencia promotora para una ARN polimerasa dependiente de ADN, y la etapa (d) además comprende la adición de una ARN polimerasa dependiente de ADN y rNTP en condiciones en las que se hace una copia de ARN del ADN de cadena sencilla y en el que la etapa (e) comprende la detección del ARN.
- 35 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha ARN polimerasa dependiente de ADN es la ARN polimerasa del bacteriofago T3, la ARN polimerasa del bacteriofago T7 o la ARN polimerasa del bacteriofago SP6.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende las etapas de:
- 40 (1) preparar una muestra de tejido a partir de una muestra histológica en la que se va a analizar la presencia del ácido nucleico diana; y
- (2) lavar la muestra;
- 45 antes de la etapa (a) de la reivindicación 1.



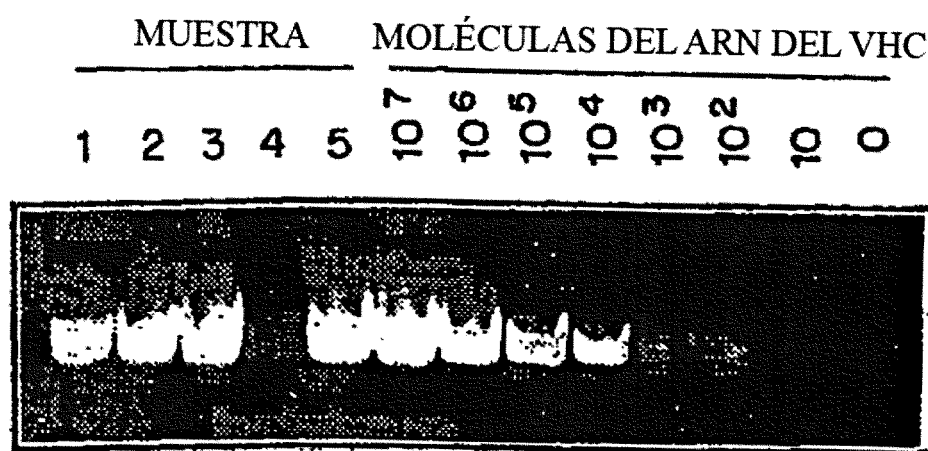


FIG. 2

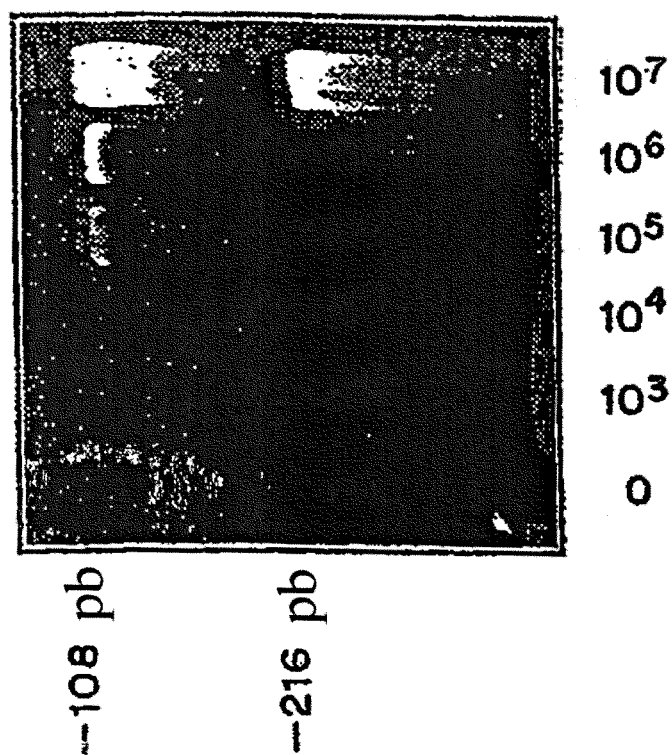


FIG. 3

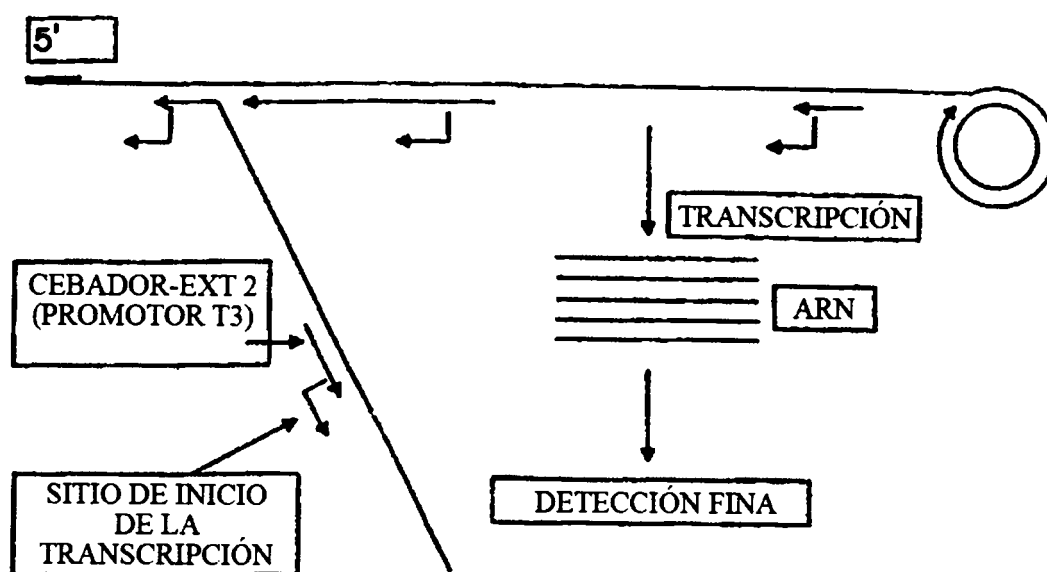


FIG. 4

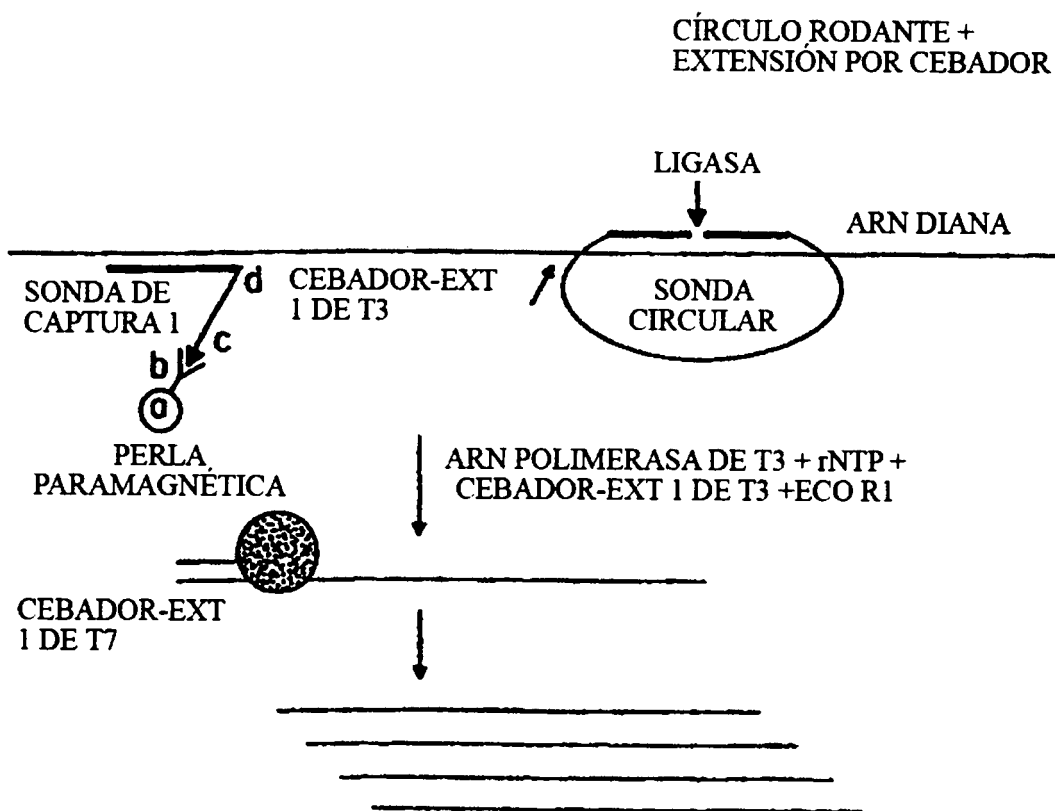


FIG. 7

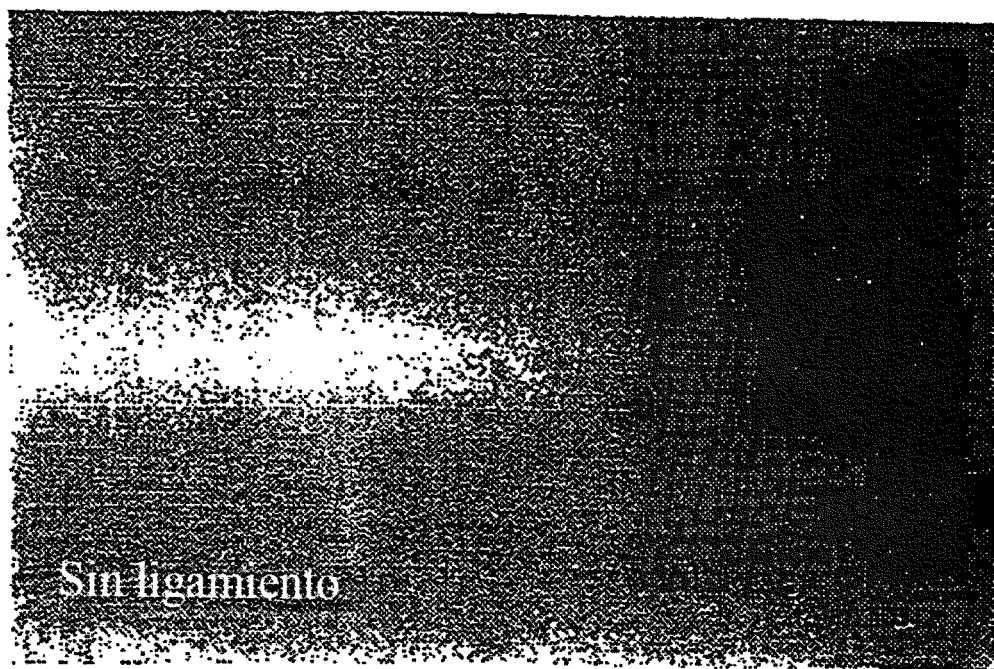


FIG. 5

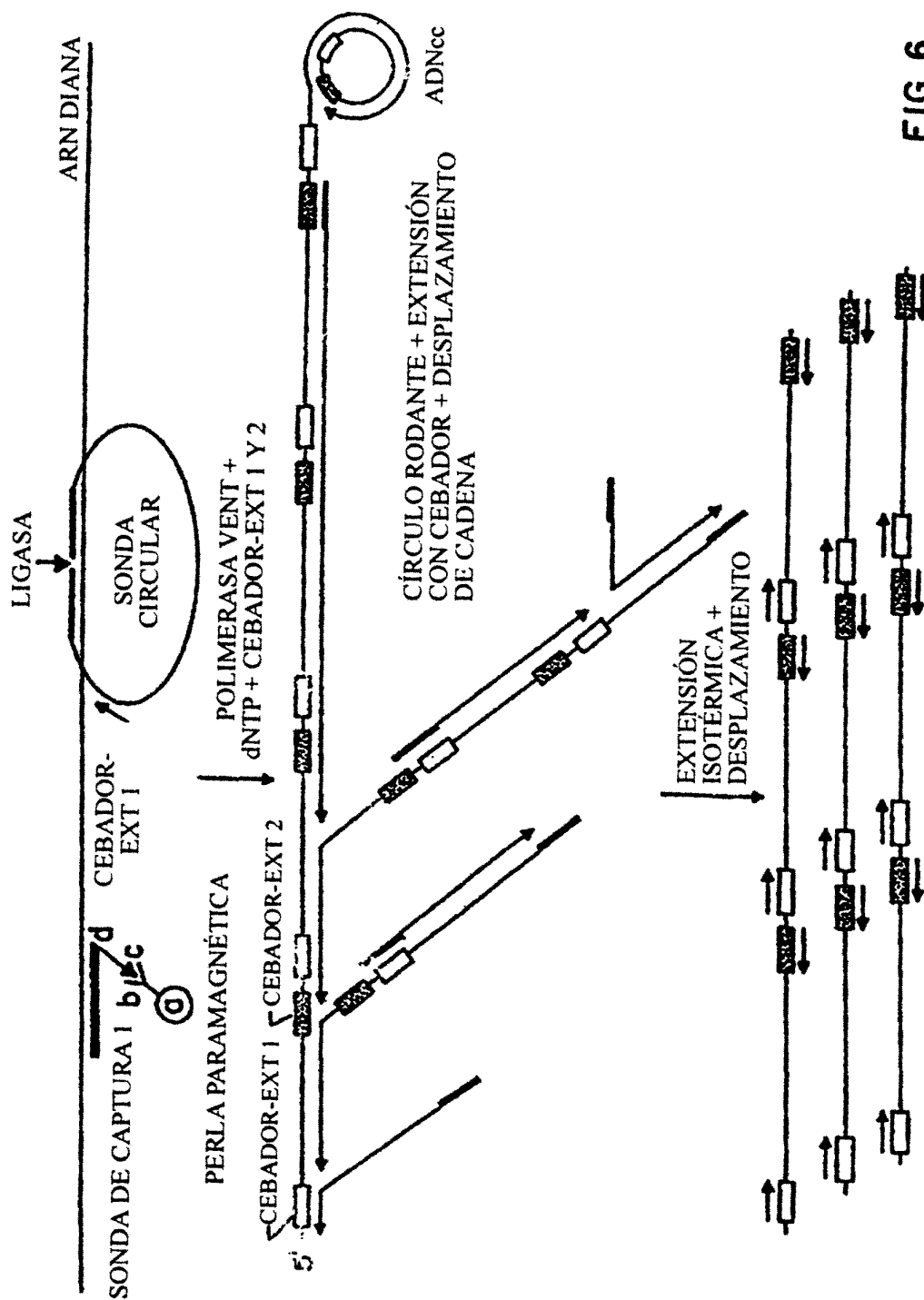


FIG. 6

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- (i) SOLICITANTE: Zhang, David Y., Brandwein, Margaret, Hsiuh, Terence C.H.
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: PROCEDIMIENTO DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS: PROCEDIMIENTO DE AMPLIFICACIÓN POR EXTENSIÓN DE RAMIFICACIÓN (RAM)
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 42
- (iv) DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA:
 - (A) DESTINATARIO: Brumbaugh, Graves, Donohue y Raymond
 - (B) CALLE: 30 Rockefeller Plaza
 - (C) CIUDAD: Nueva York
 - (D) ESTADO: NY
 - (E) PAÍS: EE.UU.
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 10112-0228
- (v) FORMA LEGIBLE EN ORDENADOR:
 - (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
 - (B) ORDENADOR: IBM compatible con PC
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release N° 1.0, Versión N° 1.25
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
 - (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
 - (C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DEL MANDATARIO/AGENTE:
 - (A) NOMBRE: MacLeod, Janet M.
 - (B) NÚMERO DE REGISTRO: 35.263
 - (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 29545-A-PCT/USA-B
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
 - (A) TELÉFONO: 212-408-2597
 - (B) TELEFAX: 212-765-2519

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 59 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1..59
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 1:

CCATCTTCCT GCTAATTTTA AGACCTGGTA ACAGGATTTTCCCGGGAATT CAAGCTTGG

59

ES 2 273 371 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 92 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..92

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 2:

```
GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG AGGTGAGAAA 60
ACCCCGTTAT CTGTATGTAC TGTTTTACT GG 92
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 151 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..151

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 3:

```
GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG AGGTGAGAAA 60
ACCCCGTTAT CTGTATGTAC TGTTTTACT GGCCATCTTC CTGCTAATTT TAAGACCTGG 120
TAACAGGATT TCCCCGGGAA TTCAAGCTTG G 151
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 90 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..90

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 4:

ES 2 273 371 T3

GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG AGGTGAGAAA 60
ACCCCGTTAT CCTGGTAACA GGATTTCOCC 90

- 5 (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº 5:
- 10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica
- 20 (B) LOCALIZACIÓN: 1..21
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº 5:
- 25 CAAGCTTGAA TTCCCGGGGA A 21
- (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº 6:
- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- 35 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- 40 (A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica
- (B) LOCALIZACIÓN: 1..20
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº 6:
- 45 GGGTTGACCC GGCTAGATCC 20
- (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº 7:
- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 54 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 55 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- 60 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica
- (B) LOCALIZACIÓN: 1..54
- 65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº 7:
- CAGGCTTATC CCGAAGTGCC TGGTAACAGG ATTTCCCCGG GAATTCAAGC TTGG 54

ES 2 273 371 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 91 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..91

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº 8:

```
GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG AGGTGAGAAA 60
ACCCCGTTAT CCGGTATTAG ACCCAGTTTC C 91
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 145 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..145

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº 9:

```
GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG AGGTGAGAAA 60
ACCCCGTTAT CCGGTATTAG ACCCAGTTTC CCAGGCTTAT CCCGAAGTGC CTGGTAACAG 120
GATTTCCTCC GGAATTCAG CTTGG 145
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 56 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..56

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº 10:

ES 2 273 371 T3

GAAGACATGC ATCCCGTGGT CCTGGTAACA GGATTTCGCC GGAATTCAA GCTTGG

56

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº 11:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 90 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 10 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
 - 15 (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1..90
 - 20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº 11:

GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG AGGTGAGAAA 60

ACCCCGTTAT CGCTAAGCG CTTCCACCA 90

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº 12:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 146 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - 35 (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
 - (ix) CARACTERÍSTICA:
 - 40 (A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1..146
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº 12:

GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG AGGTGAGAAA 60

ACCCCGTTAT CGCTAAGCG CTTCCACCA GAAGACATGC ATCCCGTGGT CCTGGTAACA 120

GGATTTCGCC GGAATTCAA GCTTGG 146

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº 13:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 56 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 60 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
 - (ix) CARACTERÍSTICA:
 - 65 (A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1..56

ES 2 273 371 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 13:

AAAGACATGC ATCCCGTGGT CCTGGTAACA GGATTTC CCC GGGAATTCAA GCTTGG

56

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 90 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..90

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 14:

GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG AAGTGAGAAA 60

ACCCCGTTAT CGCTAAAGCG CTTTCCACCT 90

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 146 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..146

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 15:

GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG AAGTGAGAAA 60

ACCCCGTTAT CGCTAAAGCG CTTTCCACCT AAAGACATGC ATCCCGTGGT CCTGGTAACA 120

GGATTTC CCC GGGAATTCAA GCTTGG 146

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 55 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

ES 2 273 371 T3

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..55

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 16:

GCAGACCACT ATGGCTCTCC CTGGTAACAG GATTTCCCCG GGAATTCAAG CTTGG

55

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 90 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..90

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 17:

GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG AGGTGAGAAA 60

ACCCCGTTAT CCGGTGTACT CACCGGTTCC 90

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 145 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..145

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 18:

GGGTTGACCC GGCTAGATCC GGGTGTGTCC TCTCTAACTT TCGAGTAGAG AGGTGAGAAA 60

ACCCCGTTAT CCGGTGTACT CACCGGTTCC GCAGACCACT ATGGCTCTCC CTGGTAACAG 120

GATTTCCCCG GGAATTCAAG CTTGG 145

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 47 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 273 371 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..47

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 19:

GGTGAAATTG CTGCCATTGT CTGTATGTTG TCTGTGTATC TGCTAAC

47

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 65 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..65

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 20:

CAAGAGCAAC TACACGAATT CTCGATTAGG TTACTGCAGC AACAGGCGGC CTTAACTGTA

60

GTACT

65

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 112 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..112

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 21:

GGTGAAATTG CTGCCATTGT CTGTATGTTG TCTGTGTATC TGCTAACCA GAGCAACTAC

60

ACGAATTCTC GATTAGGTTA CTGCAGCAAC AGGCGGCCTT AACTGTAGTA CT

112

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 273 371 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..45

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 22:

AAGAGCGTGA AGACAGTAGT TCCTCACAGG GGAGTGATTC ATGGT

45

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..45

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 23:

AAGACCCAAC ACTACTCGGC TAGCAGTCTT GCGGGGGCAC GCCCA

45

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 51 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..51

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 24:

ACTCACCGGT TCCGCAGACC ACTATGGCTC GTTGTCTGTG TATCTGCTAA C

51

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 69 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

ES 2 273 371 T3

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..69

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 25:

CAAGAGCAAC TACACGAATT CTCGATTAGG TTACTGCAGA GGACCCGGTC GTCCTGGCAA 60

TTCCGGTGT 69

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 120 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..120

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 26:

CAAGAGCAAC TACACGAATT CTCGATTAGG TTACTGCAGA GGACCCGGTC GTCCTGGCAA 60

TTCCGGTGT CTCACCGGTT CCGCAGACCA CTATGGCTCG TTGTCTGTGT ATCTGCTAAC 120

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..18

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 27:

GTTAGCAGAT ACACAGAC 18

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

ES 2 273 371 T3

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..18

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 28:

CAAGAGCAAC TACACGAA

18

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1.18

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 29:

TTCTCGATTA GGTTACTG

18

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 100 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

(B) LOCALIZACIÓN: 1..100

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 30:

CAAGAGCAAC TACACGAATT CTCGATTAGG TTAAGTGCAGC GTCTTGGCAA TTCCGGTGTG 60

CTCACCAGGT CCGCAGACCG TTGTCTGTGT ATCTGCTAAC 100

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 108 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc_característica

ES 2 273 371 T3

(B) LOCALIZACIÓN: 1..108

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 31:

5 **CCTTTCCCGA CCCAACACTA CTCGGCTGTC TGTGTATCTG CTAACCAAGA GCAACTACAC 60**
 GAATTCTCGA TTAGGTTACT GCGCACCTA TCAGGCAGTA CCACAAGG 108

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 pares de bases

15 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) COMPLEMENTARIA: NO

25 (v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 32:

30 **GCGACACTCC ACCATAGAT 19**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 33:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

40 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

45 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) COMPLEMENTARIA: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

50 (vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 33:

55 **GCTCATGGTG CACGGTCTA 19**

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

60 (A) LONGITUD: 25 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

65 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

ES 2 273 371 T3

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) COMPLEMENTARIA: NO

5 (v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 34:

10 CTTCTACAAT GAGCTGCGTG TGGCT

25

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 35:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

25 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) COMPLEMENTARIA: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

30 (vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 35:

35 CGCTCATTGC CAATGGTGAT GACCT

25

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40 (A) LONGITUD: 19 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

45 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

50 (iv) COMPLEMENTARIA: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) FUENTE ORIGINAL:

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 36:

CTGTGAGGAA CTACTGTCT

19

60 (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 37:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 pares de bases

65 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc	
5	(iii) HIPOTÉTICA: NO	
	(iv) COMPLEMENTARIA: NO	
	(v) TIPO DE FRAGMENTO:	
10	(vi) FUENTE ORIGINAL:	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 37:	
15	ACTCGCAAGC ACCCTATCA	19
	(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 38:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
20	(A) LONGITUD: 20 pares de bases	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE CADENA: sencilla	
25	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc	
	(iii) HIPOTÉTICA: NO	
30	(iv) COMPLEMENTARIA: NO	
	(v) TIPO DE FRAGMENTO:	
	(vi) FUENTE ORIGINAL:	
35	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 38:	
	AAGGCCAACC GCGAGAAGAT	20
40	(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 39:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
45	(A) LONGITUD: 18 pares de bases	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) TIPO DE CADENA: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
50	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc	
	(iii) HIPOTÉTICA: NO	
	(iv) COMPLEMENTARIA: NO	
55	(v) TIPO DE FRAGMENTO:	
	(vi) FUENTE ORIGINAL:	
60	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 39:	
	TCACGCACGA TTTCCCGC	18
	(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 40:	
65	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 45 pares de bases	

ES 2 273 371 T3

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) COMPLEMENTARIA: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 40:

AAGAGTCTCC TCCCTAGCAA AACCTCTAGG GCAGCGTAGG TCCTG

45

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 41:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) COMPLEMENTARIA: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 41

AAGAGGATCA AAACATGCGG ACCACCAGCT GGTACTTGAC CGAAG

45

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N° 42:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 109 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) COMPLEMENTARIA: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N° 42:

TCACCACCCG GGACTTGTAC CCGGGACTGT CTGTGTATCT GCTAACCAAG AGCAACTACA
CGAATTCTCG ATTAGGTTAC TGCQGAAGA CAACCACAGA CACCGTTCC

60

109