

Descripción:

## **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

5

### **1. Campo de la invención**

10 La presente invención proporciona un método y composiciones para su utilización en la unión, detección y amplificación de la detección de secuencias de ácido nucleico diana específicas en una muestra fielmente y con precisión, incluso en presencia de ácidos nucleicos íntimamente relacionados pero diferentes. La unión puede implicar la actuación como chaperonas y el montaje de moléculas específicas en montajes de unión a la diana que se unen específicamente a zonas de unión a la diana formadas por la hibridación de ácidos nucleicos sonda y secuencias de ácido nucleico diana. La  
15 amplificación puede implicar la actuación como chaperonas y/o el montaje de moléculas específicas en montajes de unión al refuerzo que se unen específicamente a las zonas de unión al refuerzo formadas por la hibridación de ácidos nucleicos de refuerzo con ácidos nucleicos sonda, ácidos nucleicos diana u otros ácidos nucleicos de refuerzo. La detección implica proporcionar uno o más marcadores detectables, incluyendo marcadores  
20 radioactivos, emisores de luz o fluorescentes, enzimáticos u otras moléculas detectables o generadoras de señal, en asociación con el ácido nucleico sonda, el montaje de unión a la diana, el ácido nucleico de refuerzo o el montaje de unión al refuerzo.

25

### **2. Antecedentes y descripción de la técnica relacionada**

30 Existe un número creciente de casos en los que es importante poder detectar ácidos nucleicos que contienen una secuencia específica, denominados en adelante ácidos nucleicos diana (TNA), en una muestra. Es deseable poder detectar los TNA con el número más pequeño de etapas de tratamiento, con los componentes más sencillos y para la exclusión de otros ácidos nucleicos similares pero diferentes, denominados en adelante ácidos nucleicos primos (CNA). Es deseable poder detectar los TNA específicos para la exclusión de cualquier y todos los CNA en la detección sencilla sin necesidad de  
35 amplificación o de otro tratamiento tras la detección.

35

40 Existen numerosos métodos que utilizan ácidos nucleicos inmovilizados o dirigidos como sondas para los TNA. Sin embargo, utilizando métodos conocidos, es difícil discriminar entre un TNA unido al ácido nucleico sonda (PNA) como opuesto a un CNA unido al PNA. Por ejemplo, una o más bases incompatibles entre el PNA y un CNA pueden todavía producir una hibridación CNA-PNA que es casi indistinguible de una hibridación TNA-PNA. Por lo tanto, la hibridación sola no es un indicador óptimo de que se haya hibridado un PNA a un TNA único.

40

45 Existen muchas situaciones en las que se utilizaría un PNA para tratar de determinar si un TNA estaba presente en una muestra que puede contener los CNA. La hibridación del PNA a cualquier CNA en esta situación limitaría el valor de diagnóstico que el PNA pudiera tener para la detección de un TNA, ausente la verificación adicional. Además, es deseable poder detectar y localizar los TNA con pocos números de copias en muestras que pueden contener muchas copias de los CNA, sin necesidad de crear copias

45

adicionales del TNA. Sería asimismo deseable poder confirmar la presencia de los CNA, independientes de los TNA, sin necesidad de separar los CNA y los TNA en la muestra.

5 Además, sería deseable poder ampliar la señal de incluso una hibridación de baja frecuencia de un TNA-PNA específico. Con este objetivo, sería deseable un método de polimerización de copias múltiples de un marcador, en adelante denominado ácido nucleico de refuerzo (BNA) en el TNA-PNA.

10 La presente invención proporciona métodos y composiciones para conseguir los objetivos deseados siguientes. Como se pone de manifiesto a partir del estudio siguiente, las presentes composiciones y métodos no han sido publicadas o sugeridas en la técnica. Un estudio general y de conjunto del estado de la técnica de detección de ácidos nucleicos se proporciona en Keller, H., M. M. Manak (1989) *DNA Probes*, Stockton Press.

15 Se ha publicado un método para detectar incompatibilidades de pares de bases por métodos químicos para determinar si se ha hibridado un PNA a un CNA en lugar de a un TNA. En la patente US nº 4.794.075 concedida a Ford *et al.*, se expone un método para distinguir fragmentos de ADN que contienen una sola base incompatible de sus homólogos perfectamente emparejados. Zonas monocatenarias en un fragmento doble se modifican con carbodiimida, que reacciona con restos de guanina (G) y timina (T) desemparejados en ADN. Las moléculas de ADN lineales dobles no reaccionan, mientras que las moléculas de ADN con una sola base desemparejada reaccionan cuantitativamente. Después de la reacción con carbodiimida, las moléculas de ADN se fraccionan en geles de poliacrilamida en alto porcentaje de modo que pueden distinguirse los fragmentos modificados y no modificados. Ford *et al.* aplicaron esta técnica para localizar y purificar diferencias de secuencia de ADN responsables de la variación del fenotipo y de enfermedades hereditarias. Aunque este método es útil para las siguientes variaciones en material genético, tiene un gran número de etapas, requiere componentes costosos y no ofrece un método directo de determinar si un PNA se ha hibridado al TNA exclusivo de los CNA en la muestra.

35 Se han realizado algunas tentativas para asegurar que por lo menos una fracción de la hibridación entre el TNA y otro ácido nucleico es complementaria. Un método implica el control de los productos de transcripción que se producen si el PNA se hibrida suficientemente a un ácido nucleico para transcribirse desde un lugar activador contenido en la sonda. La patente US nº 5.215.899 de Dattagupta da a conocer cómo se amplían las secuencias de ácido nucleico específicas mediante la utilización de una sonda en horquilla que, en la hibridación con una secuencia diana y ligadura a ésta, es capaz de transcribirse. La sonda comprende una secuencia autocomplementaria monocatenaria que, en condiciones de hibridación, forma una estructura en horquilla con una zona activadora funcional, y comprende además una secuencia de la sonda monocatenaria que se extiende desde el extremo 3' de la secuencia en horquilla. En la hibridación con una secuencia diana complementaria a la secuencia de la sonda y ligadura del extremo 3' de la secuencia diana hibridada al extremo 5' de la sonda en horquilla, la secuencia diana se vuelve transcribible en presencia de una ARN polimerasa adecuada y trifosfatos de ribonucleótido (rNTP) apropiados. La amplificación se realiza por hibridación de la secuencia deseada de TNA con la sonda, ligando el TNA al PNA, añadiendo la ARN polimerasa y los rNTP a los híbridos separados y permitiendo que proceda la transcripción hasta que se haya acumulado una cantidad deseada de producto de transcripción de

ARN. Este método implica general y específicamente la utilización del ADN en horquilla formado con un extremo desemparejado monocatenario para hibridar una secuencia diana. Cuando se une la secuencia diana, no se permite la producción de los productos de transcripción del ARN. Por lo tanto, el método conlleva la detección de productos secundarios de transcripción en lugar de la utilización de un montaje de unión del ácido nucleico para inmovilizar directamente y/o localizar una secuencia diana. Un CNA podría fácilmente unirse a la sonda, y la falta de complementariedad no interferiría necesariamente con la formación de un híbrido CNA-PNA que podría a continuación soportar la producción de productos de transcripción no deseados.

Un CNA unido al PNA podría detectarse si la falta de complementariedad interfiere con la susceptibilidad del par híbrido CNA-PNA para ser cortado por una endonucleasa de restricción. En la patente US nº 5.118.605 concedida a Urdea y en la patente US nº 4.775.619 concedida a Urdea, se proporcionaron nuevos métodos para analizar un analito de ácido nucleico, que emplea polinucleótidos con secuencias de oligonucleótidos sustancialmente homólogas a una secuencia de interés en el analito, donde la presencia o ausencia de hibridación a una severidad predeterminada proporciona la liberación de un marcador de un soporte. Se emplean varias técnicas para unir un marcador a un soporte, después de lo cual la escisión de una cadena individual o doble, un marcador puede liberarse de un soporte, y la liberación del marcador puede detectarse como indicador de la presencia de una secuencia polinucleotídica específica en una muestra. Sin embargo, esta técnica tiene el defecto de que el par CNA-PNA podría ser cortado por la endonucleasa de restricción, incluso si existe un despereamiento, siempre que el despereamiento estuviese fuera de la zona de reconocimiento de la endonucleasa. Esto conduciría a una insuficiencia del análisis para identificar un híbrido CNA-PNA.

Otro método utiliza una sonda de ADN ramificado para detectar ácidos nucleicos. La patente US nº 5.124.246 concedida a Urdea *et al.* da a conocer multímeros de oligonucleótido lineal o ramificado útiles como amplificadores en análisis bioquímico que comprenden (1) por lo menos una primera unidad de oligonucleótido monocatenaria (PNA) que es complementaria con una secuencia oligonucleotídica monocatenaria de interés (TNA), y (2) una multiplicidad de segundas unidades oligonucleotídicas monocatenarias que son complementarias con un oligonucleótido monocatenario marcado. Aunque se describen las hibridaciones ampliadas de ácido nucleico en sándwich y el inmunoanálisis que utiliza los multímeros, el método presenta la limitación de que podría suceder la limitación de la hibridación PNA-CNA y daría como resultado la producción de una señal no deseada.

Además de los métodos de identificación de los TNA, se han dado a conocer métodos para la ampliación de este ADN. En la patente US nº 5.200.314 concedida a Urdea, se detecta una cadena polinucleotídica de analito que presenta una secuencia de analito (TNA) en una muestra que contiene polinucleótidos poniendo en contacto la cadena polinucleotídica del analito con una sonda de captura (PNA) en condiciones de hibridación, donde la sonda de captura presenta un primer socio de unión específico para el TNA y una segunda secuencia de unión específica para un tercer socio de unión en fase sólida. El producto doble resultante se inmoviliza a continuación mediante la unión específica entre los socios de unión, y los polinucleótidos no unidos se separan de la especie unida. El polinucleótido del analito se desplaza opcionalmente de la fase sólida y a continuación se amplía por PCR. Los cebadores de PCR presentan cada uno una zona de

5 polinucleótido capaz de hibridarse con una zona del polinucleótido del analito, y por lo menos uno de los cebadores tiene además un socio de unión adicional capaz de unirse a un socio de unión en fase sólida. El producto ampliado se separa a continuación de la mezcla de reacción mediante la unión específica entre los socios de unión, y el producto ampliado se detecta. Aunque es posible confirmar (por PCR) que un ácido nucleico específico se haya hibridado con el PNA, la confirmación es costosa e implica múltiples etapas.

10 En cuanto a los informes que implican la interacción de un ácido nucleico bicatenario y una proteína de unión al ADN, se ha descrito un método mediante el cual se utiliza una secuencia de ADN inmovilizado que contiene lugares de unión a una única proteína para purificar esta proteína. La patente US nº 5.122.600 concedida a Kawaguchi *et al.* da a conocer una microesfera inmovilizada con ADN que comprende cadenas de ADN con secuencias básicas que se unen específicamente a una proteína determinada, y un portador que tiene un tamaño de partícula de no más de 50 µm y no menos de 0,01 µm que no adsorbe ninguna proteína, estando unido dicho portador y dichas cadenas de ADN entre sí mediante un enlace químico, y un procedimiento para purificar una proteína que utiliza dicha microesfera. Dado que éste es un procedimiento de purificación de una proteína, no se da a conocer un método de detección de un TNA ni un método por el cual más de una proteína está unida a un ácido nucleico bicatenario para la detección y localización de secuencias específicas de TNA.

25 El documento EP-A-0453301 describe un método de detección de una secuencia diana de polinucleótido en una muestra, en el que las secuencias en un TNA se detectan hibridando el primer y segundo PNA al TNA. Cada PNA contiene un compuesto doble preformado, o un compuesto doble que se forma por prolongación de la cadena, capaz de unir una secuencia de nucleótido a una proteína de unión específica.

30 El documento EP-A-0147665 da a conocer asimismo la utilización de proteínas de unión al ADN doble específico para la secuencia como método de detección en un análisis de hibridación. De nuevo, se preforma la sonda doble.

35 El documento EP-A-0450594 da a conocer la posibilidad de marcar las denominadas moléculas desarrolladoras con compuestos específicos con secuencia doble, p. ej. determinados intercaladores. Estos compuestos se unen a las moléculas desarrolladoras antes de la hibridación.

40 El documento US-A-4556643 da a conocer la detección no radiactiva de secuencias nucleotídicas específicas en una muestra, que conlleva la hibridación de una sonda que contiene secuencias específicas para la proteína que se une al ADN.

45 El documento WO 93/00446 da a conocer oligonucleótidos monocatenarios que comprenden una parte que, cuando es bicatenaria, se une a la proteína UL9 procedente del virus del Herpes simple, y una parte adicional que, cuando es bicatenaria, se une a compuestos intercaladores.

## SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Proporciona métodos mediante los cuales las secuencias específicas de ácido nucleico diana (TNA) se detectan mediante la utilización de ácidos nucleicos sonda (PNA) que, en la hibridación con los TNA, pueden unir montajes de unión a la diana (TBA). Cada TBA une por lo menos una zona específica del par híbrido PNA-TNA, la zona de unión a la diana (TBR). El TBA está compuesto por una o más moléculas, una o más de las cuales puede unirse a secuencias de TBR en función de la secuencia o configuración específica. El TBA puede comprender una o más secuencias de pilotaje denominadas "PILOTS" o "secuencias con asimetría", que ensamblan y obligan a los componentes de la unión del nucleótido del TBA a geometrías específicas. Los PILOTS actúan para ensamblar las unidades de reconocimiento específicas del ácido nucleico u otros pilotos a los que se unen las unidades de reconocimiento específicas del ácido nucleico en los TBA de manera predeterminada. El TBA puede también contener una o más moléculas que se anclan o localizan el TBA.

En la reivindicación 1 se definen los PNA según la invención. Las utilidades de estos ácidos nucleicos se definen en otras reivindicaciones así como los kits que las comprenden.

Los PNA, además las secuencias específicas para TNA, contienen también una o más secuencias, 1/2 BBR, capaces de hibridarse con 1/2 BBR complementarias en ácidos nucleicos de refuerzo (BNA). Por hibridación de los BNA añadidos a 1/2 BBR iniciadores presentes en los PNA, las prolongaciones de los PNA se hacen en forma de PNA-BNA y a continuación de híbridos BNA-BNA. Estas prolongaciones contienen una o más zonas de unión al refuerzo (BBR). Cada BBR es capaz de unir un montaje de unión al refuerzo (BBA). El BBA está compuesto de moléculas, una o más de las cuales pueden unirse a una BBR de manera específica y en función de la secuencia o configuración. El BBA puede comprender una o más secuencias de pilotaje denominadas "PILOTS" o "Secuencias con asimetría", que ensamblan y obligan a los componentes de la unión del nucleótido del TBA a geometrías específicas. Los PILOTS actúan para ensamblar unidades de reconocimiento específicas del ácido nucleico u otros pilotos a los que se unen las unidades de reconocimiento específicas del ácido nucleico en los BBA de manera predeterminada. El BBA puede contener moléculas que anclan o localizan el BBA o que permiten la detección de los BBA unidos y por esta razón de los complejos TBA-TNA-PNA a los que, a su vez, están unidos. Se dan a conocer métodos y composiciones para la utilización de los 1/2 BBR, BNA, BBR, BBA y PILOTS BBA, incluyendo su utilización como componentes y kits de análisis de diagnóstico y forense.

Se dan a conocer métodos y composiciones para procedimientos de análisis y la producción de un kit para análisis que contiene los PNA, TBA, TBR, BNA, BBR y BBA y HNA para la detección, localización y diferenciación de secuencias específicas de ácido nucleico, incluyendo las secuencias de ácido nucleico que se encuentran en las células humanas, en el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), papilomavirus humano (PVH) y en otros sistemas que contienen ácido nucleico que incluyen virus y bacterias.

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar métodos y composiciones para su utilización en la unión, detección y amplificación de la

detección de secuencias específicas de ácido nucleico diana en una muestra con fidelidad y precisión, incluso en presencia de secuencias de ácido nucleico íntimamente relacionadas pero diferentes.

5 Por consiguiente, un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar métodos y composiciones para la creación de montajes de unión a la diana que unen específicamente zonas de unión a la diana formadas por la hibridación de ácido nucleico sonda y secuencias de ácido nucleico diana.

10 Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un método y composiciones para la creación de montajes de unión al refuerzo que unen específicamente zonas de unión al refuerzo formadas por hibridación de secuencias de ácido nucleico de refuerzo con ácidos nucleicos sonda y ácidos nucleicos en horquilla.

15 Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un método y composiciones para su utilización en la amplificación de la detección de montajes de unión a la diana unidos a zonas de unión a la diana que utilizan montajes de unión al refuerzo y ácidos nucleicos de refuerzo.

20 Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un método y composiciones que permitan la utilización de uno o más marcadores detectables, incluyendo pero sin limitarse a marcadores radioactivos, emisores de luz, fluorescentes, enzimáticos u otras moléculas generadoras de señal. Estos marcadores se utilizan en asociación con ácidos nucleicos sonda, montajes de unión a la diana, montajes de unión al refuerzo, ácidos nucleicos de refuerzo o ácidos nucleicos en horquilla.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

30 En la **Figura 1** están contenidas las siguientes ilustraciones: la **Figura 1-I** es un PNA que contiene una 1/2 TBR, que es una secuencia monocatenaria que es complementaria con un TNA y una secuencia 1/2 BBR. La **Figura 1-IIa** es un TNA al que se añaden los componentes de la Figura 1-I y, en condiciones de hibridación, se une el PNA para formar los componentes de la **Figura 1-IIIa**, un híbrido PNA-TNA que contiene por lo menos una TBR. La **Figura 1-IVa** es un BNA que se añade a los componentes de la **Figura 1-IIIa** y, en condiciones de hibridación se une a la 1/2 BBR de la **Figura 1-IIIa** para formar un híbrido PNA-BNA que contiene una BBR mostrada en la **Figura 1-Va**.

40 La **Figura 1-IIb** es un BNA al que se añaden los componentes de la Figura 1-I y que, en condiciones de hibridación, se une el PNA para formar los componentes de la **Figura 1-IIIb**, un híbrido PNA-TNA que contiene una BBR. La **Figura 1-IVb** es un TNA que se añade a los componentes de la **Figura 1-IIIb** y que, en condiciones de hibridación se une a la 1/2 TBR de la **Figura 1-IIIb** para formar un híbrido PNA-BNA que contiene una TBR mostrada en la **Figura 1-Vb**.

45 La **Figura 1-IIc** es un HNA al que se añaden los componentes de la Figura 1-I y que, en condiciones de hibridación, se une el PNA para formar los componentes de la **Figura 1-IIIc**, un híbrido PNA-HNA que contiene una BBR. La **Figura 1-IVc** es un TNA que se añade a los componentes de la **Figura 1-IIIc** y que, en condiciones de hibridación se

une a la 1/2 TBR de la Figura 1-IIIc para formar un híbrido PNA-BNA que contiene una BBR mostrada en la **Figura 1-Vc**.

5 Los híbridos que forman las TBR y BBR son útiles en la presente invención. Los PNA y BNA, indicados en la Figura 1, pueden contener un soporte y/o indicador no unidos (OSA), o un soporte unido u otros medios de localización, incluyendo, pero sin limitarse, al acoplamiento a perlas, polímeros y superficies y/o indicadores.

10 La **Figura 2a** es un diagrama de estrategias para la polimerización de los BNA en los PNA y encapsulado por los HNA.

La **Figura 2b** es un diagrama de otras estrategias para ampliar las señales de PNA-TNA por polimerización de los BNA y coronación por los HNA.

15 La **Figura 3** es un diagrama que presenta la utilización de los BNA que contienen múltiples 1/2 BBR por BNA.

20 La **Figura 4a** es un diagrama que presenta la unión de los TBA y los BBA a las TBR y BBR, y la capacidad del TBA para discriminar entre los TNA y los CNA. Según esta forma de realización, si el TBA está inmovilizado, bien en una perla, superficie de placa de microvaloración o cualquier otra superficie, solamente los complejos tales como el complejo X serían retenidos y detectados, mientras que los complejos tales como el complejo XI no.

25 La **Figura 4b** es un diagrama que ejemplifica escenarios similares a los mostrados en la **Figura 4a** pero en un orden de aparición ligeramente diferente.

30 La **Figura 5** es un diagrama que ejemplifica los PNA que contienen entre una 1/2 TBR y ninguna 1/2 BBR para los PNA que contienen hasta cinco 1/2 TBR y una 1/2 BBR. Los elementos (a) y (b) de cada número (I, II, III, IV y V) forman una serie que, durante la hibridación a un TNA, proporcionan las TBR con (elementos (a)) o sin (elementos (b)) una 1/2 BBR disponible para la ampliación por hibridación a los BNA que tienen 1/2 BBR complementarias.

35 La **Figura 6a** es un diagrama que ejemplifica una TNA específica que tiene dos 1/2 TBR que, durante la unión a un PNA apropiado, forma dos TBR íntimamente asociadas capaces de unir dos TBA. Se proporciona también una 1/2 BBR para la ampliación.

40 La **Figura 6b** es un diagrama que muestra los mismos escenarios que en la Figura 6a excepto que en éste, se utiliza un doble TBA de modo que la discriminación entre las TBR aisladas que se producen en muestras celulares normales pueden discriminarse de las TBR dobles, anormales.

45 La **Figura 6c** es un diagrama que presenta el mismo escenario que en la Figura 6a excepto que en éste, se identifican cinco TBR en el TNA. Cada TBR puede estar unida a un TBA igual o diferente, y cada TBA puede estar marcado de manera diferente, lo que permite la confirmación de que los cinco puntos están presentes en el TNA.

La **Figura 6d** es un diagrama de los mismos escenarios que en la Figura 6c excepto

que aquí, se muestra un TBA doble, ampliando lo que se muestra en la Figura 6b para la utilización del TBA doble. Un ejemplo del TNA mostrado en el apartado II en las Figuras 6a, 6b, 6c y 6d es el ADN o ARN monocatenario del VIH.

5 La **Figura 7** presenta la LTR del VIH como un TNA, y dos PNA, y una estrategia para la detección del TNA utilizando los PNA.

10 La **Figura 8** es un esquema de una forma de realización de la invención en el que un montaje que se une a la diana se utiliza para unir un híbrido TNA-PNA, y se utilizan montajes de unión al refuerzo para unir los BNA polimerizados.

15 La **Figura 9** es un esquema de un TBA modular en el que se utilizan secuencias de montaje, secuencias enlazadoras y secuencias con asimetría para chaperonar unidades de reconocimiento de ácido nucleico unidas deseadas para formar un TBA.

La **Figura 10** presenta los TBA modulares útiles para la detección de secuencias específicas para VIH.

20 La **Figura 11** presenta TBA modulares útiles para la detección de secuencias de papilomavirus humano. Cada unidad de E2 es realmente un dímero del fragmento de E2 de que se une al ADN.

25 La **Figura 12a** es un esquema del fraccionamiento del TNA y del desplazamiento en la movilidad debido a la unión de un TBA.

La **Figura 12b** es un esquema del fraccionamiento del TNA y del desplazamiento mejorado en la movilidad debido a la unión de los BBA además de los TBA.

30 La **Figura 13** presenta una estrategia de detección para las secuencias de delección; un ejemplo de la utilización de esta estrategia es para un ensayo de integración del papilomavirus humano.

35 La **Figura 14** presenta el montaje de los TBA de orden superior mediante la utilización de unidades de reconocimiento de ácido nucleico, enlazador, montaje y secuencias de asimetría de modo que se forman varios montajes de unión a la diana específicos para los lugares de unión en la LTR del VIH.

40 La **Figura 15** presenta el montaje de los TBA de orden superior mediante la utilización de unidades de reconocimiento de ADN, enlazador, montaje y secuencias de asimetría de modo que se forman varios montajes de unión a la diana específicos para los lugares de unión en el genoma del HPV.

45 La **Figura 16** presenta la discriminación conseguida utilizando un TBA complejo y la capacidad de las moléculas competidoras endógenas que se unen a la diana para eliminar la unión del TBA a un ácido nucleico primo pero no del TNA que contiene la orientación apropiada de más de un punto reconocido por el TBA.

La **Figura 17** presenta la capacidad de un TBA para dirigirse específicamente a unir los puntos de la secuencia desemparejada y para unir preferentemente los puntos sobre los

puntos primos que no contienen todos los desemparejamientos dirigidos.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS**

5

La **SEC. ID. nº 1** corresponde a la Figura 5-la-1 y presenta el lugar de unión de NF-kB a MHC de clase I.

10

La **SEC. ID. nº 2** corresponde a la Figura 5 (Ia) y presenta el lugar de unión de NF-kB a B2-microglobulina.

La **SEC. ID. nº 3** corresponde a la Figura 5 (Ia) y presenta el lugar de unión de NF-kB a kappa inmunoglobulina.

15

La **SEC. ID. nº 4** corresponde a la Figura 5 (Ia) y presenta uno de los lugares de unión de NF-kB al VIH.

20

La **SEC. ID. nº 5** corresponde a la Figura 5 (Ia) y presenta uno de los lugares de unión de NF-kB al VIH.

La **SEC. ID. nº 6** corresponde a la Figura 5 (Ia) y presenta el lugar de unión de NF-kB a c-myc.

25

La **SEC. ID. nº 7** corresponde a la Figura 5 (IIa) y presenta el lugar de unión doble de NF-kB al VIH.

La **SEC. ID. nº 8** corresponde a la Figura 5 (IIa) y presenta el lugar de unión doble de NF-kB al VIH.

30

La **SEC. ID. nº 9 a nº 16** corresponde a la Figura 5 (IIa) y muestra un lugar de unión doble con un punto que es un lugar de unión a NF-kB del VIH, y el otro punto que es un lugar de unión de SPI al VIH.

35

Las **SEC. ID. nº 17 y nº 18** corresponden a la Figura 5 (IIa) y presentan un lugar de unión doble de SP1 al VIH.

Las **SEC. ID. nº 19 a nº 31** corresponden a la Figura 5 (IIIa) y muestra un lugar de unión doble de NF-kB al VIH y un lugar de unión de SPI al VIH.

40

Las **SEC. ID. nº 32 y nº 33** corresponden a la Figura 5 (IVa) y muestran un lugar de unión cuádruple donde dos puntos son los lugares de unión de NF-kB al VIH y dos puntos son los lugares de unión de SP1 al VIH.

45

Las **SEC. ID. nº 34** corresponde a la Figura 5 (VIa) y muestra un lugar de unión quíntuple donde dos puntos son los lugares de unión de NF-kB al VIH y tres puntos son los lugares de unión de SP1 al VIH.

La **SEC. ID. nº 35** es un ejemplo de una 1/2 BBR, en este caso los elementos OL1, OL2 y OL3 del operador izquierdo del bacteriófago lambda, que incluye secuencias que

intervienen.

5 La **SEC. ID. nº 36** es un ejemplo de una 1/2 BBR, en este caso los elementos OL3, OL2 y OL1 del operador derecho del bacteriófago lambda, que incluye secuencias que intervienen.

La **SEC. ID. nº 37** es la LTR del VIH.

10 La **SEC. ID. nº 38** es un PNA complementario del PNA de la LTR del VIH.

La **SEC. ID. nº 39** es un PNA complementario de un PNA diferente de la LTR del VIH de la SEC. ID. nº 38.

15 La **SEC. ID. nº 40** es un PNA complementario con parte de la LTR del VIH y contiene también una 1/2 BBR y una prolongación de la secuencia para la polimerización de los BNA en el PNA.

La **SEC. ID. nº 41** es un BNA complementario de 1/2 BBR de la SEC. ID. nº 40.

20 La **SEC. ID. nº 42** es un BNA que se polimerizará sobre el BNA de la SEC. ID. nº 41 y que, con las SEC. ID. nº 40 y nº 41, crea un punto de reconocimiento *Pst*I.

25 La **SEC. ID. nº 43** es un BNA que es complementario del BNA de la SEC. ID. nº 42 y que completa un punto de reconocimiento *Bam*HI.

La **SEC. ID. nº 44** es un HNA que presenta un punto de reconocimiento *Bam*HI que se hibridará con el punto de reconocimiento *Bam*HI creado por las SEC. ID. nº 42 y 43 para el polímero en desarrollo.

30 La **SEC. ID. nº 45** es un segundo PNA que, como en la SEC. ID. nº 40, es complementario con parte de la LTR del VIH, pero no con la misma secuencia SEC. ID. nº 40. La SEC. ID. nº 45 también codifica una 1/2 BBR y una prolongación que permitirá la polimerización de los BNA partiendo de un punto de reconocimiento *Sph*I.

35 Las **SEC. ID. nº 46 a nº 62** son papilomavirus humanos (HPV) específicos para los PNA que, en la hibridación con secuencias de HPV, forman las TBR que se unen a las proteínas de unión del ADN del HPV.

40 Las **SEC. ID. nº 63 a nº 71** son unidades de reconocimiento del ADN de NF-kB para la incorporación en los TBA.

La **SEC. ID. nº 72** es una secuencia de localización nuclear.

45 La **SEC. ID. nº 73** es una unidad de reconocimiento de la secuencia SP1.

La **SEC. ID. nº 74** es una unidad de reconocimiento de la proteína de unión TATA.

Las **SEC. ID. nº 75 a 84** son unidades de reconocimiento del ADN del papilomavirus E2.

Las **SEC. ID. nº 85 a 92** son secuencias con asimetría.

5 La **SEC. ID. nº 93** es una unidad de reconocimiento de la proteína de unión TATA de arabidopsis.

La **SEC. ID. nº 94** es una unidad de reconocimiento de la proteína de unión del ADN a HPV-16-E2-1.

10 La **SEC. ID. nº 95** es una unidad de reconocimiento de la proteína de unión del ADN a HPV-16-E2-2.

15 La **SEC. ID. nº 96** es una unidad de reconocimiento de la proteína de unión del ADN a HPV-18-E2.

La **SEC. ID. nº 97** es una unidad de reconocimiento de la proteína de unión del ADN a HPV-33-E2.

20 La **SEC. ID. nº 98** es una unidad de reconocimiento de la proteína de unión del ADN al papilomavirus E2 bovino.

Las **SEC. ID. nº 99 a 102** son secuencias enlazadoras modelo.

25 La **SEC. ID. nº 103** es una secuencia señal modelo de localización nuclear (NLS).

Las **SEC. ID. nº 104 a 108** son secuencias chaperonas modelo.

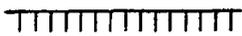
Las **SEC. ID. nº 109 a 116** son secuencias modelo de TBA ensambladas.

30 La **SEC. ID. nº 117** es un lugar de unión de NF-kB de consenso.

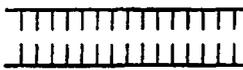
La **SEC. ID. nº 118** es una secuencia de aminoácidos Tat del VIH.

35

### ABREVIATURAS

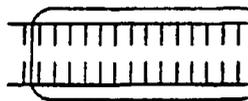


ácido nucleico monocatenario



ácido nucleico bicatenario

40



zona de unión en el ácido nucleico



sin soporte ni indicadores, ni soporte sólido, ni otros medios de

		localización, incluyendo, pero sin limitarse a, acoplamiento a perlas, polímeros y superficies, o indicadores = OSA
5	BBA	montaje de unión al refuerzo
	BBR	zona de unión al refuerzo
	BNA	ácido nucleico de refuerzo
10	CNA	ácido nucleico primo
	1/2 BBR	zona monocatenaria que, cuando se hibrida con la secuencia complementaria de un HNA o de un BNA, puede unirse a un BBA
15	1/2 TBR	zona monocatenaria del PNA que, cuando se hibrida con la secuencia complementaria de un TNA, puede unirse a un TBA
	OSA	soporte o acoplamiento opcional, círculo con cuadrado
20	PNA	ácido nucleico sonda
	TBA	montaje de unión a la diana
	TBR	zona de unión a la diana
25	TNA	ácido nucleico diana
	HNA	ácido nucleico en horquilla

30

### **DEFINICIONES**

35 Debe entenderse asimismo a partir de la descripción siguiente que cuando se hace referencia a expresiones tales como montajes de unión a la diana (TBA), montajes de unión al refuerzo (BBA), proteínas de unión al ADN, proteínas de unión al ácido nucleico o proteínas de unión al ARN, lo que se pretende son las composiciones compuestas por moléculas que se unen a secuencias de ácido nucleico diana ADN o ARN (TNA) con independencia de la especificidad de la categoría de las moléculas de unión de las que proceden. Por lo tanto, por ejemplo, un TBA adaptado para unirse a las secuencias del virus de la inmunodeficiencia humana pueden ser más similares a un factor de transcripción NF-KB que una típicamente secuencias de ADN. Sin embargo, tal como se utiliza en la presente memoria, debe entenderse que el TBA puede adaptarse para la utilización óptima a unirse a secuencias de ARN de una composición o configuración de secuencia específica.

45 La fidelidad del método de detección dado a conocer en la presente memoria depende en gran medida de la unión selectiva de los TBA y BBA a motivos de ácido nucleico específicos. Debe entenderse en toda esta descripción que las bases de discriminación de TBA y BBA de los TNA de las secuencias relacionadas (ácidos nucleicos primos o CNA) puede ser la formación de segmentos híbridos precisos de ácido nucleico sonda (PNA)-ácido

nucleico diana (TNA) (híbridos PNA-TNA). Sin embargo, la base de la discriminación puede también ser precisamente la formación de una configuración determinada, y puede no requerir la ausencia completa de emparejamiento de bases incompatibles en el híbrido TNA-PNA. Por consiguiente, la base de la operación de TBA o BBA debe entenderse completamente que depende de la discriminación de alguna propiedad única en el híbrido TNA-PNA al contrario que algunas propiedades presentadas por algunos híbridos PNA-CNA que pueden formarse en una muestra de ensayo puesta en contacto con un PNA dado.

## EXPOSICIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se define a partir de las reivindicaciones adjuntas. Proporciona un método para identificar específicamente un ácido nucleico diana (TNA) en una muestra mediante la utilización de montajes de unión a la diana (TBA) que incorporan proteínas de unión del ácido nucleico específicas. Utilizando ácidos nucleicos sonda (PNA) específicos para una secuencia de TNA dada, y un TBA que es específico para la zona de unión a la diana doble (TBR) formada durante la formación de las secuencias de TNA-PNA híbridas, se forma un complejo TBA-TNA-PNA estable. Proporcionando además secuencias ampliables específicas en el PNA, además de las secuencias que contribuyen específicamente a la formación de la TBR reconocida por el TBA, se detecta la unión del PNA al TNA y la detección ampliada. Con este fin, puede utilizarse cualquiera de entre los numerosos sistemas de ampliación del ácido nucleico, incluyendo la reacción en cadena de polimerasa, o la utilización del ADN ramificado, cada rama del cual contiene un marcador detectable. En particular, en la presente memoria se describe un nuevo método de ampliación en el que la parte ampliable del PNA contiene secuencias en las que pueden polimerizar ácidos nucleicos de refuerzo (BNA). Durante la formación de cada híbrido BNA-PNA, se forma una zona de unión al refuerzo (BBR) a la que se une específicamente el montaje de unión al refuerzo (BBA). Si se marcan de forma detectable, los BBA o los BNA proporcionan esencialmente la ampliación ilimitada del episodio de unión de TNA-PNA original.

Según la presente invención, debe entenderse que el TNA incluye secuencias específicas de ácido nucleico. Debe entenderse que el TBA es cualquier montaje molecular que pueda unirse específica e íntimamente a un híbrido formado por TNA-PNA. El TBA contendrá una o más moléculas cuyas secuencias son suficientes para unirse a la TBR. Los dominios de unión del ácido nucleico que se conocen pueden utilizarse directamente como componentes del TBA o modificarse según las instrucciones proporcionadas en la presente memoria. Las moléculas disponibles más fácilmente con tales secuencias son los dominios de unión al ADN de las proteínas de unión al ADN. Específicamente, se conocen muchas proteínas de unión al ADN o al ARN que pueden utilizarse directamente como la proteína no modificada conocida, o el TBA puede ser una proteína de unión al ácido nucleico, modificada según las instrucciones específicas proporcionadas en la presente memoria. En este último caso, las modificaciones específicas que son deseables deberían incluir la optimización de afinidades de unión, la eliminación de las actividades no deseadas (tales como la actividad de la nucleasa y la reorganización del TBA en presencia de otras moléculas con afinidad para los componentes del TBA), la optimización de la selectividad de una secuencia diana sobre las secuencias íntimamente relacionadas y la optimización de la estabilidad.

Ejemplos de proteínas de unión al ADN que podrían utilizarse según la presente invención son los fragmentos de unión al ADN del factor de transcripción NF-kB (p50 y p65),

NF-IL6, NF-AT, rel, TBP, la proteína E2 del virus del papiloma, sp1, los represores *cro* y CI del bacteriófago lambda, y proteínas similares son proteínas bien conocidas cuyo fragmento de unión al ADN se ha aislado, clonado, secuenciado y caracterizado. Además, se incluye cualquier otra proteína de unión al ADN o parte de una proteína que es necesaria y suficiente para unirse a un híbrido de TBR o a un BBR. Esto incluye proteínas o partes de proteínas naturales con actividad alterada de unión al ADN así como proteínas creadas con especificidad de unión alterada al ADN, tal como el intercambio de una hélice de reconocimiento de la unión al ADN desde una proteína a otra. Además, las proteínas que presentan unión al ácido nucleico y otras funciones del ácido nucleico, tales como las endonucleasas de restricción, pudieron utilizarse como función de unión del ácido nucleico. Se incluyen las proteínas que se unen a zonas diana en híbridos ADN-ARN así como en híbridos ARN-ARN. (Véase, por ejemplo, Shi 1995, DeStefano 1993, Zhu 1995, Gonzales 1994, Salazar 1993, Jaishree 1993, Wang 1992, Roberts 1992, Kainz 1992, Salazar 1993(b)). Pueden construirse montajes de unión con la utilización de una molécula cuyas partes chaperonas del montaje de unión de manera que puedan conseguirse combinaciones y geometrías específicas. Esta molécula se denomina en la presente memoria PILOT. Los pilotos pueden estar compuestos por proteínas o cualquier combinación de materiales orgánicos e inorgánicos que consiga la selección combinatoria y/o que produzca geometrías específicas entre los miembros del TBA o de los BBA. Una chaperona es una estructura estable en la que puede construirse un TBA o un BBA de modo que se proporcione la configuración correcta del TBA o BBA mientras que al mismo tiempo se eliminan las propiedades indeseables de una proteína que se une al ácido nucleico natural. Como ejemplo específico de esta forma de realización, se proporciona una versión modificada del factor de transcripción pleyotrópico, NF-kB, utilizando una proteína *cro* del bacteriófago lambda modificado como chaperona. Cada dímero de unión NF-kB conserva la afinidad de unión y picomolar para el lugar de unión NF-kB mientras que al mismo tiempo el montaje de unión presenta varias características ventajosas de preparación, estabilidad y especificidad.

A la vista de lo anterior, se describen a continuación con detalle varios aspectos y formas de realización de la presente invención.

1. Ácidos nucleicos sonda (PNA) y su preparación. Los PNA de la presente invención comprenden por lo menos tres partes principales unidas. En cuanto a la Figura 1(I) de los dibujos, la primera parte del PNA es una o más secuencias de bases, denominada "1/2 TBR". En cuanto a la Figura 1(I y IIa) de los dibujos, la 1/2 TBR en el PNA es complementaria con una secuencia de interés en una muestra, el TNA que contiene una 1/2 TBR. En cuanto a la Figura 1(IIIa) de los dibujos, cuando se añade el TNA al PNA en condiciones de hibridación, forma un híbrido PNA-TNA que contiene una TBR. En cuanto a la Figura 1(I) de los dibujos, la segunda parte del PNA es una secuencia de bases, denominada "1/2 BBR". En cuanto a la Figura 1(I, IIb, IIc y IVa) de los dibujos, la 1/2 BBR en el PNA es complementaria con una 1/2 BBR contenida en un BNA o un HNA. En cuanto a la Figura 1 (IIIb, IIIc y Va) de los dibujos, cuando se añade el BNA o HNA al PNA en condiciones de hibridación, forma un híbrido PNA-BNA o un híbrido PNA-HNA, respectivamente que contiene una BBR. En cuanto a la Figura 1(I) de los dibujos, la tercera parte del PNA es el OSA, señalado con un círculo con una casilla a su alrededor. El OSA no es soporte ni indicador, o soporte sólido, u otros medios de localización, incluyendo pero sin limitarse a, acoplamiento a perlas, polímeros y superficies y/o indicadores que está(n) covalentemente unido(s), o no covalentemente, pero específicamente, asociado al PNA. El OSA puede ser un átomo o molécula que ayude a la separación y/o localización tal como un

grupo de unión del soporte sólido o una etiqueta que puede detectarse por varios medios físicos, incluyendo, pero sin limitarse a, la adsorción o detección por imagen de las partículas o luz emitidas. Los métodos para acoplar indicadores a oligonucleótidos o para inmovilizar oligonucleótidos a soportes sólidos son bien conocidos en la técnica (véase Keller y Manak, *supra*).

El PNA de la presente invención puede prepararse por cualquier método adecuado. Dichos métodos, en general, incluirán la síntesis de oligonucleótidos y la clonación en un vector replicable. Los métodos para la síntesis de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. Cuando se clonan o sintetizan, puede ser necesaria la purificación y separación de la cadena para utilizar el producto como PNA puro. Los métodos de preparación de sondas de ARN son bien conocidos (véase por ejemplo Blais 1993, Blais 1994, que utiliza la transcripción *in vitro* de una reacción PCR que incorpora un activador de T7 ARN polimerasa).

Los expertos en la materia entenderán que la longitud y la secuencia específica del PNA depende de la longitud y secuencia que va a detectarse en un TNA, y de las estructuras para conseguir la unión íntima y específica del TBA específico que va a utilizarse (véase la exposición sobre los TBA a continuación). En general, los PNA de secuencias largas comprendidas entre aproximadamente 10 y aproximadamente 300 nucleótidos de longitud son adecuadas, con longitudes de aproximadamente 15 a 100 nucleótidos siendo deseable para muchas de las formas de realización específicamente ejemplificadas en la presente memoria.

Debe entenderse que el PNA puede construirse de modo que contenga más de una 1/2 TBR y para producir más de una TBR por cada uno o más TBA, iguales o diferentes, así como las TBR complejas reconocidas por los nuevos TBA dobles y múltiples (véase la descripción a continuación en relación con estos nuevos TBA) durante la hibridación de los PNA y los TNA. La Figura 5 ilustra los PNA específicos que contienen una o más 1/2 TBR. Las secuencias específicas que corresponden a las secuencias de 1/2 TBR ilustradas en la Figura 5 (Ia, IIa, IIIa, IVa y Va) son las SEC. ID. nº 1 a nº 34 (véase la Descripción de Secuencias anterior).

Como se muestra en las Figuras 2a y 2b, el PNA, que contiene una 1/2 TBR, puede hibridarse con uno o más BNA (véase la descripción a continuación) y la cadena de los BNA polimerizados en cualquier longitud potencial deseada para la ampliación del episodio de hibridación TNA-PNA. Preferentemente, entre 1 y 10 1/2 BBR estarán presentes en el PNA.

Como se muestra en las Figuras 6a y 6b, el PNA puede contener varias 1/2 TBR, iguales o diferentes, que pueden hibridarse con varias 1/2 TBR en un TNA. Cada vez se forma una 1/2 TBR en los emparejamientos de PNA una 1/2 TBR en un TNA, una zona de unión a la diana, TBR, que puede unirse a un TBA. Además, no es esencial que todas las TBR estén en un único PNA contiguo. Por lo tanto, en una forma de realización de la invención, se utilizan dos PNA diferentes para detectar las secuencias en un TNA específico. Como ilustración de este aspecto de la invención, la Figura 7 presenta una representación de la repetición terminal larga (LTR) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Como es conocido en la técnica, la LTR del VIH comprende dos lugares de unión a NF-kB y tres lugares de unión a SP1, en íntima proximidad, en los que NF-kB y SP1 son proteínas de unión al ADN conocidas. La Figura 7 proporciona dos PNA, PNA1 (SEC. ID. nº 38) y PNA2

(SEC. ID. nº 39), cada uno de los cuales es complementario con la cadena opuesta mostrada como TNA (SEC. ID. nº 37), que presenta los dos lugares de unión a NF-kB y los tres lugares de unión a SP1 de la LTR del VIH. Según este aspecto de la invención, PNA1 se hibrida específicamente con esta sección del TNA mostrada en la Figura 7 cuyas bases se subrayan con un símbolo "+", mientras que PNA2 se hibrida específicamente con esta sección del TNA mostrada en la Figura 7 cuyas bases se subrayan con un símbolo "=". Cada PNA1 o PNA2 puede contener también secuencias (indicadas por los símbolos "#" o "\*\*") que se hibridarán con secuencias 1/2 BBR de los BNA (véase a continuación). Además, cada PNA1 y PNA2 puede estar activado diferencialmente con un OSA, tal como un fluoróforo tal como una fluoresceína o un marcador de rodamina, que permitiría la confirmación de que ambas sondas han llegado a unirse al TNA. Si solamente un marcador o ningún marcador se detecta, se concluye que el TNA no está presente en la muestra que se está analizando.

En un aspecto adicional de la forma de realización mostrada en la Figura 7, se presenta un método para alterar la especificidad del presente método de análisis. Cambiando la longitud del hueco entre PNA1 y PNA2, de modo que la zona de TNA que queda sin hibridar se altera, una puesta en práctica de la presente invención puede alterar la discriminación del análisis.

A fin de ejemplificar más claramente este aspecto de la invención, es necesario recalcar que la TBR puede tener una estructura helicoidal. Por lo tanto, aunque el PNA1 crea las TBR en una "cara" de la hélice, el PNA2 crea una TBR en la misma o diferente cara de la hélice, dependiendo de la distancia entre el medio de cada TBR (subrayada en la Figura 7). Si el medio de cada lugar de unión es un producto entero de 10,5 bases aparte, las TBR estarán en el mismo lado de la hélice, mientras que los productos no enteros de 10,5 bases aparte colocarían las TBR en lados opuestos de la hélice. De este modo, cualquier operación en la unión por el TBA que reconoce la TBR del PNA1 y la TBA que reconoce la TBR del PNA2 puede manipularse (véase Hochschild, A., M. Ptashne [1986] *Cell* 44:681-687, que presenta este efecto para la unión del represor del bacteriófago lambda para dos puntos de operador diferentes situados a diferentes distancias uno el otro en una hélice de ADN). Como describe Perkins *et al.* ([1993] *EMBO J.* 12:3551-3558), se requiere la cooperación entre los puntos de NF-kB y de SP1 para conseguir la activación de la LTR del VIH. Sin embargo, para el objetivo de la presente invención, el motivo doble del lugar de unión de SP1 a la triple NF-kB en la LTR del VIH puede considerarse ventaja al proporcionar una única proteína de unión nueva capaz de unirse a ambos puntos simultáneamente, pero solamente si la distancia entre los puntos es geoméricamente factible. Esto se controla tanto mediante la estructura del TBA seleccionado como por los PNA utilizados. Por lo tanto, en la forma de realización ejemplificada en la Figura 7, las dos sondas pueden utilizarse con una zona intersonda suficientemente grande del ADN monocatenario que permanece de modo que, incluso si los lugares de unión de NF-kB y SP1 están en lados opuestos de la hélice, la zona monocatenaria entre las sondas proporciona una "articulación" suficientemente flexible de modo que el ADN puede tanto curvarse como enroscarse para adaptarse a la geometría del TBA. Alternativamente, puede diseñarse un ensayo más severo estrechando la distancia intersonda de modo que el ADN pueda solamente curvarse, pero no enroscarse. Por último, las sondas pueden espaciarse tan íntimamente, o utilizarse un solo PNA, de modo que pueda curvarse el ADN solamente pero no enroscarse. Por lo tanto, esta figura ejemplifica y permite la producción de sistemas de detección con cualquier grado de discriminación deseado dado entre los ácidos nucleicos diana que presentan secuencias similares, pero diferentes yuxtaposiciones de estas secuencias.

Desde el punto de vista de un kit de diagnóstico o forense para el VIH, los expertos en la materia apreciarán que los aspectos de la presente invención mencionados anteriormente permiten la adaptación de los componentes del kit de diagnóstico o forense para emparejar lo que se conoce en cualquier momento dado acerca de las cepas frecuentes de VIH u otro patógeno o enfermedad. Asimismo los expertos en la materia apreciarán que, aunque la detección de la infección por VIH no sea la única utilidad de la presente invención, debido a la mutabilidad del genoma del VIH, es probablemente uno de los medios de ensayo más complejos para dicho diagnóstico. Es precisamente en dicho medio mutable, sin embargo, donde la flexibilidad del presente método, acoplado a su capacidad para discriminar entre secuencias muy estrechamente relacionadas, puede ser más claramente apreciada. En medios menos mutables, no necesita utilizarse alguna de las sofisticaciones a las que esta invención se adecua. Por lo tanto, en un kit de diagnóstico para la infección por papilomavirus, todas las características de la discriminación de la interacción TBA-TBR están disponibles, junto con la capacidad para ampliar la señal utilizando los BNA y los BBA, pero un solo PNA sencillo, tal como cualquiera de las SEC. ID. nº 46 a 62, puede utilizarse el cual identifica las únicas secuencias de papilomavirus, que también son conocidas por unirse a un TBA tal como la proteína E2 de papilomavirus o al ADN truncado que se une a partes de éste (véase Hegde *et al.* [1992] *Nature* 359:505-512; Monini *et al.* [1991] *J. Virol.* 65:2124-2130).

Al aplicar el presente método a la detección de un TNA determinado con el fin de evaluar si determinados ácidos nucleicos que están presentes están asociados a la evolución de melanomas, hematomas, cánceres de mama, cervical, pulmonar, de colon, de próstata, de páncreas o de ovario, el TNA puede obtenerse a partir de materiales de la biopsia extraídos de órganos y fluidos que se sospecha que contienen las células cancerosas. Para la detección de insuficiencias genéticas, el TNA puede obtenerse de muestras de pacientes que contienen las células afectadas. Para la detección de contaminantes y productos de fermentación para la preparación de productos alimenticios, químicos o de biotecnología o para la biodegradación de residuos, el TNA puede obtenerse a partir de muestras extraídas en varias etapas en el proceso de fermentación o de tratamiento. Para la detección de patógenos o contaminantes de alimentos o fármacos, la muestra de TNA puede obtenerse a partir del alimento o fármaco, exudados de alimento o superficies en contacto con el alimento, fluidos en contacto con el alimento, materiales de tratamiento, fluidos y similares asociados a la preparación de alimento, fármaco o muestras biológicas o en contacto con los mismos extraídos de éstos en contacto con el alimento, fármaco o similares.

2. Ácidos nucleicos de refuerzo (BNA), zonas de unión al refuerzo (BBR) y su preparación. Los BNA de la presente invención están compuestos de por lo menos una o más 1/2 BBR acopladas a un OSA. Las 1/2 BBR pueden hibridarse con 1/2 BBR complementarias contenidas en el PNA, otros BNA o en un HNA.

Haciendo referencia a la Figura 1(I, IIb y IIIb) de los dibujos, el BNA más sencillo se compone de dos partes. En cuanto a la Figura 1(IIb) de los dibujos, la primera parte del BNA más sencillo es una secuencia de bases que es complementaria con la secuencia en el PNA que se denomina "1/2 BBR". En cuanto a la Figura 1(IIIb) de los dibujos, la segunda parte del BNA más sencillo es el OSA, señalado con un círculo con una casilla a su alrededor. El OSA no es soporte ni indicador, o soporte sólido, u otros medios de localización, incluyendo pero

sin limitarse a, acoplamiento a perlas, polímeros y superficies y/o indicadores que está(n) covalentemente unido(s), o no covalentemente, sino específicamente, asociado al BNA.

5 Haciendo referencia a la Figura 2a(II y III) de los dibujos, el BNA puede contener más de una secuencia de 1/2 BBR. El BNA ilustrado en la Figura 3(II) contiene una secuencia que es complementaria de la del PNA ilustrada en la Figura 3(I) y otras dos secuencias de 1/2 BBR. El BNA ilustrado en la Figura 3(III) contiene dos secuencias de 1/2 BBR que son complementarias con dos de las secuencias 1/2 BBR en el BNA ilustrado en la Figura 3(II), más hasta "n" 1/2 BBR adicionales para la polimerización de los BNA adicionales.

10 En las condiciones de hibridación, el BNA ilustrado en la Figura 3(II), cuando se combina con el PNA ilustrado en la Figura 3(I), crea el híbrido PNA-BNA ilustrado en la Figura 3(IVa) que contiene una BBR y una prolongación no hibridada con dos secuencias 1/2 BBR adicionales o con secuencias "de refuerzo". Las BBR creadas mediante dicha hibridación pueden ser de secuencias idénticas, similares o diferentes. Las BBR creadas mediante dicha hibridación pueden unir BBA idénticos, similares o diferentes (véase a continuación). Los BNA pueden haberse preparado de manera análoga a los PNA.

15 En las condiciones de hibridación, el BNA-BNA ilustrado en la Figura 3(IVb), cuando se combina con el PNA ilustrado en la Figura 3(Vb), crea el híbrido PNA-BNA ilustrado en la Figura 3(VI) que contiene una BBR, dos híbridos BNA-BNA adicionales que contienen las BBR y una prolongación no hibridada con una secuencia 1/2 BBR adicional, una secuencia de "refuerzo". Las BBR creadas mediante dicha hibridación pueden unir BBA con secuencias idénticas, similares o diferentes. Las BBR creadas mediante dicha hibridación pueden unir BBA idénticos, similares o diferentes (véase a continuación). Los BNA pueden prepararse de manera análoga a la preparación de los PNA.

20 3. Ácidos nucleicos diana (TNA) y su preparación. La primera etapa para detectar y amplificar señales producidas por detección de un TNA determinado según el presente método es la hibridación de dicha diana con el PNA en una mezcla adecuada. Dicha hibridación se consigue en condiciones adecuadas bien conocidas en la técnica.

25 La muestra que se sospecha o se sabe que contiene el TNA deseado puede obtenerse a partir de variadas fuentes. Puede ser una muestra biológica, una muestra de alimento o agrícola, una muestra medioambiental, etcétera. Al aplicar el presente método a la detección de un TNA determinado con objeto de diagnósticos médicos o forenses, el TNA puede obtenerse a partir de una muestra de biopsia, de un fluido o exudado corporal tales como orina, sangre, leche, fluido cerebroespinal, esputo, saliva, heces, aspiraciones pulmonares, exudados faríngeos o genitales y similares. Además, la detección puede ser *in situ* (véase por ejemplo Embretson 1993; Patterson 1993; Adams 1994).

30 Por consiguiente, los PNA específicos para vertebrados (incluyendo los mamíferos y los seres humanos) o alguno o todos de los siguientes microorganismos de interés pueden observarse y utilizarse según el presente método:

35 Corinebacterias

*Corynebacterium diphtheria*

Bacilos

40 *Bacillus thuringiensis*

	<u>Neumocos</u>	
	<i>Diplococcus pneumoniae</i>	
	<u>Estreptococos</u>	
5	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
	<i>Streptococcus salivarius</i>	
	<u>Estafilococos</u>	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Staphylococcus albus</i>	
10	<u>Pseudomonas</u>	
	<i>Pseudomonas stutzen</i>	
	<u>Neisseria</u>	
	<i>Neisseria meningitidis</i>	
	<i>Neisseria gonorrhoea</i>	
15	<u>Enterobacteriaceas</u>	
	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Aerobacteria aerogenes</i>	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacterias coniformes
	<i>Salmonella typhosa</i>	
20	<i>Salmonella choleraesuis</i>	Salmonelas
	<i>Salmonella typhimurium</i>	
	<i>Shigellae dysenteriae</i>	
	<i>Shigellae schmitzii</i>	
	<i>Shigellae arabinotarda</i>	
25	<i>Shigellae flexneri</i>	Sigelas
	<i>Shigellae boydii</i>	
	<i>Shigellae sonnei</i>	
	<u>Otros bacilos entéricos</u>	
	<i>Proteus vulgaris</i>	
30	<i>Proteus mirabilis</i>	Especie Proteus
	<i>Proteus morgani</i>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	
	<i>Vibrio cholerae</i>	
35	<u>Grupo Hemofilus-Bordetella</u>	
	<i>Hemophilus influenza, H. ducryi</i>	
	<i>Hemophilus hemophilus</i>	
	<i>Hemophilus aegypticus</i>	
	<i>Hemophilus parainfluenzae</i>	
40	<i>Bordetella pertussis</i>	
	<u>Pasteurelas</u>	
	<i>Pasteurella pestis</i>	
	<i>Pasteurella tularensis</i>	
	<u>Brucelas</u>	
45	<i>Brucella melitensis</i>	
	<i>Brucella abortus</i>	
	<i>Brucella suis</i>	
	<u>Bacilos formadores de esporas aeróbicas</u>	
	<i>Bacillus anthracis</i>	
	<i>Bacillus subtilis</i>	

	<i>Bacillus megaterium</i>
	<i>Bacillus cereus</i>
	<u>Bacilos formadores de esporas anaeróbicas</u>
5	<i>Clostridium botulinum</i>
	<i>Clostridium tetani</i>
	<i>Clostridium perfringens</i>
	<i>Clostridium novyi</i>
	<i>Clostridium septicum</i>
10	<i>Clostridium histolyticum</i>
	<i>Clostridium tertium</i>
	<i>Clostridium bifermentans</i>
	<i>Clostridium sporogenes</i>
	<u>Micobacterias</u>
15	<i>Mycobacterium tuberculosis hominis</i>
	<i>Mycobacterium bovis</i>
	<i>Mycobacterium avium</i>
	<i>Mycobacterium leprae</i>
	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>
	<u>Actinomicetos (bacterias fungiformes)</u>
20	<i>Actinomyces israeli</i>
	<i>Actinomyces bovis</i>
	<i>Actinomyces naeslundii</i>
	<i>Nocardia asteroides</i>
	<i>Nocardia brasiliensis</i>
25	<u>Espiroquetas</u>
	<i>Treponema pallidum</i>
	<i>Treponema pertenue</i>
	<i>Treponema carateum</i>
	<i>Spirillum minus</i>
30	<i>Streptobacillus moniliformis</i>
	<i>Borrelia recurrentis</i>
	<i>Leptospira icterohemorrhagiae</i>
	<i>Leptospira canicola</i>
	<u>Tripanosomas</u>
35	<u>Micoplasmas</u>
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
	<u>Otros patógenos</u>
	<i>Listeria monocytogenes</i>
	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
40	<i>Streptobacillus moniliformis</i>
	<i>Donvania granulomatis</i>
	<i>Bartonella bacilliformis</i>
	<u>Rickettsias (parásitos pseudobacterianos)</u>
45	<i>Rickettsia prowazekii</i>
	<i>Rickettsia mooseri</i>
	<i>Rickettsia rickettsii</i>
	<i>Rickettsia conori</i>
	<i>Rickettsia australis</i>
	<i>Rickettsia sibiricus</i>

*Rickettsia akari*  
*Rickettsia tsutsugamushi*  
*Rickettsia burnetti*  
*Rickettsia quintana*

5 Clamidia (parásitos bacterianos/víricos no clasificables)  
Agentes de clamidia (denominación imprecisa)

Hongos

10 *Cryptococcus neoformans*  
*Blastomyces dermatidis*  
*Histoplasma capsulatum*  
*Coccidioides immitis*  
*Paracoccidioides brasiliensis*  
*Candida albicans*  
*Aspergillus fumigatus*  
15 *Mucor corymbifera* (*Absidia corymbifera*)  
*Rhizopus oryzae*  
*Rhizopus arrhizus* Ficomycetos  
*Rhizopus nigricans*  
*Sporotrichum schenkii*  
20 *Fonsecaea pedrosoi*  
*Fonsecaea compact*  
*Fonsecaea dermatidis*  
*Cladosporium carrioni*  
*Phialophora verrucosa*  
25 *Aspergillus nidulans*  
*Madurella mycetomi*  
*Madurella grisea*  
*Allescheria boydii*  
*Phialophora jeanselmei*  
30 *Microsporum gypsum*  
*Trichophyton mentagrophytes*  
*Keratinomyces ajelloi*  
*Microsporum canis*  
*Trichophyton rubrum*  
35 *Microsporum adouini*

Virus

Adenovirus

Herpes virus

40 *Herpes simplex*  
*Varicella* (Varicela)  
*Herpes zoster* (Herpes)  
Virus B  
Citomegalovirus

Pox virus

45 *Variola* (Viruela)  
*Vaccinia*  
*Poxvirus bovis*  
*Paravaccinia*  
*Molluscum contagiosum*

	<u>Picornavirus</u>
	Virus de la poliomielitis
	Virus Coxsackie
5	Enterovirus
	Rinovirus
	<u>Mixovirus</u>
	Gripe (A, B y C)
	Paragripe (1-4)
10	Virus de parotiditis
	Virus de la enfermedad de Newcastle
	Virus del sarampión
	Virus de la peste bovina
	Virus del moquillo canino
15	Virus sincitial respiratorio
	Virus de la rubéola
	<u>Arbovirus</u>
	Virus de la encefalitis equina oriental
	Virus de la encefalitis equina occidental
20	Virus de Sindbis
	Virus de Chikugunya
	Virus del bosque Semliki
	Virus de Mayora
	Virus de la encefalitis de St. Louis
25	Virus de la encefalitis de California
	Virus de la fiebre de la garrapata de Colorado
	Virus de la fiebre amarilla
	Virus Dengue
	<u>Reovirus</u>
30	Reovirus tipos 1 a 3
	<u>Retrovirus</u>
	Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)
	Virus I y II linfotrófico de linfocitos T humanos (HTLV)
	<u>Hepatitis</u>
35	Virus de la hepatitis A
	Virus de la hepatitis B
	Virus de hepatitis ni A ni B
	Hepatitis C, D y E
	<u>Virus tumorales</u>
40	Virus de la leucemia de Rauscher
	Virus de Gross
	Virus de la leucemia de Maloney
	Virus de papiloma humano

45 Un experto en la materia debería entender que se requiere generalmente tratar muestras que se sospecha que contienen un TNA determinado de tal modo que produzcan fragmentos que puedan hibridarse fácilmente con el PNA. Puede ser necesario tratar la muestra de la prueba para efectuar la liberación del TNA o para extraerlo por hibridación, tal como exponiendo sangre u otras células a un medio hipotónico, o si no desestabilizando la muestra utilizando medios más potentes. Cuando se piensa que el TNA está presente en

forma bicatenaria, sería deseable naturalmente separar las cadenas para hacer hidrolizable el TNA en forma monocatenaria por los métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse al calentamiento o a la exposición limitada a condiciones alcalinas que puede neutralizarse en el momento de la adición del PNA monocatenario para permitir que tenga lugar la hibridación. Los métodos para preparar dianas de ARN son bien conocidos (véase Waterhouse 1993, Mitchell 1992).

La fragmentación de las muestras de ácido nucleico que contienen los TNA se necesita normalmente para disminuir la viscosidad de la muestra y para aumentar la accesibilidad de los TNA a los PNA. Dicha fragmentación se realiza por métodos aleatorios o específicos conocidos en la técnica. Así, por ejemplo, las nucleasas específicas conocidas para cortar con una frecuencia determina en el genoma específico que se está analizando, pueden utilizarse para producir fragmentos de un tamaño molecular medio conocido. Además, otras nucleasas, fosfodiesterasas, exonucleasas y endonucleasas, cizallamiento físico y tratamiento con ultrasonidos son todos los métodos adecuados para este fin. Estos procedimientos son bien conocidos en la técnica. Se prefiere generalmente la utilización de enzimas de restricción para la fragmentación del ADN. Sin embargo, el ADN puede fragmentarse también por una variedad de medios químicos tales como la utilización de los siguientes tipos de reactivos: EDTA-Fe (II) (según Stroebel *et al.* [1988] *J. Am. Chem. Soc.* 110:7927; Dervan [1986] *Science* 232:464); Cu (II)-fenantrolina (según Chen y Sigman [1987] *Science* 237:1197); enzima de restricción de clase IIS (según Kim *et al.* [1988] *Science* 240:504); ADNasa híbrida (según Corey *et al.* [1989] *Biochem.* 28:8277); bleomicina (según Umezawa *et al.* [1986] *J. Antibiot.* (Tokio) Ser. A, 19:200); neocarcinostatina (Goldberg *et al.* [1981] *Second Annual Bristol-Myers Symposium in Cancer Research*, Academic Press, Nueva York, pág. 163); y metidiopropil-EDTA-Fe (II) (según Hertzberg *et al.* [1982] *J. Am. Chem. Soc.* 104:313). La eliminación de las proteínas, tal como por tratamiento con una proteasa, es también generalmente deseable y son bien conocidos en la técnica los métodos para efectuar la eliminación de las proteínas de las muestras de ácido nucleico, sin pérdida apreciable de ácido nucleico.

Los TNA de la presente invención deberían ser lo suficientemente largos para que exista una cantidad suficiente de híbrido bicatenario al lado de la TBR de modo que un TBA pueda unirse sin ser perturbado por los extremos del fragmento no ligado. Típicamente, los fragmentos comprendidos en el intervalo entre aproximadamente 10 nucleótidos y aproximadamente 100.000 nucleótidos, y preferentemente en el intervalo entre aproximadamente 20 nucleótidos y aproximadamente 1.000 nucleótidos se utilizan como tamaño medio para los fragmentos de TNA. Ejemplos de secuencias de TNA específicas que podrían detectarse son las secuencias complementarias a las secuencias de PNA descritas en la presente memoria para la detección de secuencias celulares normales, secuencias celulares anormales (como en los oncogenes activados, los genes extraños integrados, los genes con defectos genéticos) y secuencias de ácido nucleico específico para el patógeno, para las que las proteínas que unen ácido nucleico específico son conocidas, o que pueden producirse según los métodos descritos en esta descripción. En cuanto a la Figura 7, un TNA relacionado con el VIH específico se muestra como SEC. ID. nº 37.

4. Prolongaciones en el PNA utilizando los BNA, su preparación y amplificación de señal. En las condiciones de hibridación, pueden añadirse los BNA que se hibridan con los PNA, los híbridos PNA-BNA, los BNA y los híbridos BNA-BNA. Las adiciones mencionadas

anteriormente pueden realizarse en modo polimérico no vectorial o en modo vectorial, en un orden conocido de los BNA.

5 En cuanto a la Figura 2a, se presenta un refuerzo sencillo. Un polímero de refuerzo se produce añadiendo dos BNA, ilustrados en la Figura 2a(Ib y Ic), que cuando se combinan en las condiciones de hibridación con el PNA, forman híbridos PNA-BNA-BNA, compuestos por el PNA y "prolongaciones de refuerzo", ilustradas en la Figura 2a(IIa, IIb, IIc y IId) dejando por lo menos una secuencia 1/2 BBR no emparejada. Cada secuencia de 1/2 BBR no emparejada, ilustrada en la Figura 2a(IIa, IIb, IIc y IId) puede hibridarse con los BNA adicionales para formar prolongaciones "de refuerzo" adicionales. Cada secuencia de 1/2 BBR no emparejada, ilustrada en la Figura 2a(IIa, IIb, IIc y IId) puede hibridarse con los HNA adicionales, ilustrados en la Figura 2a(IIIa y IIIb). La hibridación de los HNA, que no pueden hibridar los BNA adicionales, actúa para "coronar" la adición de los BNA sobre el PNA, como se ilustra en la Figura 2a(IVa, IVb, IVc y IVd).

15 En cuanto a la Figura 2b, es posible controlar y especificar el orden y los componentes de las prolongaciones al PNA. Si se requiere una sola BBR, se añade un HNA que contiene la secuencia complementaria a la 1/2 BBR en el PNA para producir una sola BBR y "coronar" algunas prolongaciones "de refuerzo" al PNA. Si van a añadirse BBR adicionales al PNA, puede realizarse una prolongación controlada del PNA.

20 En cuanto a la Figura 2b, se presenta un refuerzo sencillo. La prolongación del polímero vectorial se realiza añadiendo un BNA que es específico para el PNA, como se ilustra en la Figura 2b(Ia y IIa), que cuando se combinan en condiciones de hibridación con el PNA, forman híbridos PNA-BNA-BNA, compuestos por el PNA y las prolongaciones del "refuerzo". Estas prolongaciones, si están marcadas con un OSA, proporcionan un método para ampliar en gran medida cualquier señal producida en la unión de un PNA a un TNA en la muestra. Además, uniendo los BBA marcados a las BBR en el polímero, se consigue una ampliación adicional.

25 Puede utilizarse alguno de los numerosos métodos para preparar los BNA, incluyendo, p. ej., síntesis por métodos químicos o de producción de ADN recombinante. En este último método, puede producirse un número esencialmente ilimitado de BNA simplemente y de manera económica, por ejemplo, mediante la producción en procariontes (por ejemplo en *E. coli*) de un ADN del plásmido con múltiples repeticiones de las secuencias específicas de BNA flanqueadas por secuencias de restricción que tienen extremos sobresalientes. De este modo, por ejemplo, las secuencias izquierda o derecha del operador del bacteriófago lambda o de cualquier otro ADN u otra secuencia de ácido nucleico conocida para unir específica e íntimamente un BBA determinado, tal como una proteína de unión al ADN o al ARN, puede producirse en un número de copias esencialmente ilimitado, estando cada copia flanqueada por un *EcoRI*, *PstI*, *BamHI* o cualquiera de las numerosas otras secuencias de restricción comunes de nucleasa. Alternativamente, puede escindirse un polímero en secuencias repetidas mediante secuencias de restricción únicas no presentes en el polímero. Grandes cantidades de pBR322, plásmido pUC u otro plásmido que tiene copias múltiples de estas secuencias son producidas por métodos bien conocidos en la técnica, el plásmido corta con la enzima de restricción que flanquea la secuencia polimerizada, y las múltiples copias liberadas de los operadores se aíslan por cromatografía o por cualquier otro método conveniente conocido en la técnica. El BNA, antes de su utilización, se separa a continuación de la cadena y es

5 adecuado a continuación para la polimerización en un PNA que codifica una copia  
complementaria monocatenaria de un operador tal como una 1/2 BBR. Los BNA pueden  
polimerizarse vectorialmente en el PNA utilizando diferentes enzimas de restricción para  
flanquear cada repetición del polímero en el plásmido utilizado para producir múltiples copias  
del BNA. Alternativamente, el polímero BNA puede hibridarse con el PNA mediante  
prolongaciones en uno o ambos extremos del polímero BNA, sin necesidad de separar la  
cadena e hibridar cada segmento de BNA. Ejemplos de secuencias de BNA específicas se  
proporcionan anteriormente en el apartado titulado Descripción de Secuencias, tal como las  
SEC. ID. nº 35 a nº 36. Para utilizar el polímero BNA, puede utilizarse la ADN ligasa para  
10 unir covalentemente los BNA hibridados.

15 5. Ácidos nucleicos en forma de horquilla (HNA) y su preparación. Los HNA descritos  
en la presente memoria comprenden por lo menos dos partes principales unidas: Una  
secuencia monocatenaria, que es complementaria con una 1/2 BBR, y una zona de ácido  
nucleico bicatenario formada, en condiciones de hibridación, por autoasociación de  
secuencias autocomplementarias con el HNA. En cuanto a la Figura 1(IIc) de los dibujos, la  
1/2 BBR en el HNA puede construirse de modo que sea complementaria con la secuencia  
de 1/2 BBR en el PNA. En cuanto a la Figura 1(I, IIc y IIIc) de los dibujos, el HNA  
mencionado anteriormente, cuando se añade al PNA en condiciones de hibridación, forma  
20 un híbrido PNA-HNA que contiene una BBR. En cuanto a la Figura 1(IIIc, IVc y Vc) de los  
dibujos, un híbrido PNA-HNA, en condiciones de hibridación, en la adición del TNA, puede  
formar un híbrido TNA-PNA-HNA que contiene un TBR y una BBR.

25 En cuanto a la Figura 2a y 2b, los HNA pueden utilizarse para “coronar” o terminar la  
adición de las prolongaciones del BNA al PNA. Los dos BNA en la Figura 2a(Ib y Ic) pueden  
asociarse para formar el híbrido mostrado en la Figura 3(IVb) o pueden hibridarse  
directamente e individualmente con el PNA tal como se ilustra en la Figura 2a(Ia-c, IIa-d).  
Los dos HNA (mostrados en la Figura 2a(IIIa y IIIb)) pueden terminar la hibridación del BNA  
con otros BNA que se extienden desde el PNA, como se ilustra en la Figura 2a (IVa-d). El  
30 HNA en la Figura 2a(IIIa) puede terminar los híbridos PNA-BNA mostrados en la Figura  
2a(IIb y IIc) y cualquier híbrido PNA-BNA con una 1/2 BBR monocatenaria que es  
complementaria con la 1/2 BBR en el HNA ilustrado en la Figura 2a(IIIa). Asimismo, el HNA  
en la Figura 2a(IIIb) puede terminar los híbridos PNA-BNA mostrados en la Figura 2a(IIa y  
IIc) y cualquier híbrido PNA-BNA con dos 1/2 BBR monocatenarias que son  
35 complementarias con las 1/2 BBR en el HNA ilustrado en la Figura 2a(IIIb).

40 Los HNA están contruidos para que terminen los híbridos PNA-BNA que están  
construidos a partir de la adición sucesiva de los BNA al PNA como se ilustra en la Figura  
(2b). Las secuencias de 1/2 BBR monocatenarias ilustradas en la Figura 2b(Ia, IIIa, Va y  
VIIa) son específicamente complementarios con las secuencias de 1/2 BBR monocatenarias  
ilustradas en la Figura 2b(Ib, IIIb, Vb y VIIb) y producen los únicos híbridos PNA-BNA-HNA  
coronados ilustrados en la Figura 2b(Ic, IIIc, Vc y VIIc).

45 Las secuencias autocomplementarias en el HNA y la secuencia en bucle que une las  
secuencias en horquilla autocomplementarias puede ser de cualquier composición y  
longitud, siempre que no impidan sustancialmente o inhiban la presentación de la 1/2 BBR  
monocatenaria que comprende parte del HNA por el HNA o que une selectivamente el BBA  
o el TBA. Las secuencias en bucle deberían seleccionarse de modo que la formación del  
bucle no impida la formación de la horquilla. Ejemplos de un HNA útil en esta aplicación se

proporciona como SEC. ID. nº 44 (véase la Descripción de secuencias anterior).

5 6. Montajes de unión a la diana (TBA) y su preparación. Un TBA puede ser cualquier sustancia que se una a una TBR específica formada por hibridación de los TNA y PNA específicos con la condición de que TBA debe tener por lo menos las siguientes propiedades:

10 (a) El TBA debe unir la(s) TBR(s) de manera que sea muy específico para la(s) TBR(s) de interés. Es decir, el TBA debe discriminar entre las TBR presentes en el híbrido TNA-PNA y las secuencias dobles similares formadas por los híbridos PNA-CNA. El TBA debe unir el híbrido PNA-CNA con una avidez tal que durante el lavado el complejo TBA-TNA-PNA, el híbrido PNA-CNA se desplace y el híbrido PNA-TNA no se desplace;

15 (b) El TBA debe unir con avidez la(s) TBR(s) creada(s) por hibridación del TNA con el PNA. Generalmente se consideran suficientes las afinidades de unión comprendidas en el intervalo entre  $10^{-5}$  y aproximadamente  $10^{-12}$  o superiores. Como se indica a continuación, en algunos casos, puede ser deseable utilizar un TBA determinado que tenga una avidez muy baja para un TBR determinado, pero  
20 que tenga una avidez muy aumentada cuando se proporcione una configuración determinada de múltiples TBR de modo que el cuadrado de la afinidad del TBA para cada TBR sea la afinidad de relevancia para este TBA determinado.

25 Ejemplos de los componentes útiles que se unen al ADN en la formación de los TBA incluyen, pero no se limitan a NF-kB, proteína E2 de papilomavirus, factor de transcripción SP1, enzimas de restricción inactivas, anticuerpos, etc. Cada una de estas proteínas se ha reconocido en la técnica que contiene secuencias que se unen a determinadas secuencias de ácido nucleico y las afinidades de estas interacciones son conocidas. Naturalmente, el  
30 método de la presente invención no se limita a la utilización de estas conocidas proteínas de unión al ADN o a fragmentos de las mismas. A partir de la presente descripción, es evidente para un experto normal que el presente método podría aplicarse fácilmente a la utilización de los nuevos TBA que presentan por lo menos las propiedades requeridas indicadas anteriormente. Así, por ejemplo, en el documento WO 92/20698, se describió una molécula que se une al ADN específico para la secuencia que comprende un conjugado  
35 oligonucleotídico formado por el enlace covalente de un ADN que se une al fármaco a un oligonucleótido de triple formación. El método de esta descripción podría utilizarse para producir nuevos TBA para su utilización según la presente descripción, con tal que los TBA formados de este modo reúnan los criterios descritos anteriormente. Además, los métodos de las patentes US nº 5.096.815, nº 5.198.346 y WO 88/06601, pueden utilizarse para  
40 generar nuevos TBA para su utilización según el método de la presente invención. Podrían utilizarse anticuerpos específicos o fragmentos de los mismos (véase por ejemplo Blais 1994).

45 Cuando el TBA es una proteína, o un complejo de proteínas, debe reconocerse que pueden utilizarse algunos de los numerosos métodos de rutina en la técnica para producir el TBA. El TBA puede aislarse a partir de su medio natural en la naturaleza, o si esto no es práctico, producirse por técnicas habituales de la biología molecular. Así, utilizando NF-kB como ejemplo, que utiliza el ADN que se une a fracciones de subunidades p50 o p65, este montaje de unión podría producirse según los métodos recombinantes conocidos en la

técnica (véase por ejemplo Ghosh [1990] *Cell* 62:1019-1029, que describe la clonación de la subunidad de NF-kB que se une al ADN p50 y la homología de esta proteína con *rel* y *dorsal*).

5           Se conocen muchos ADN y otras proteínas que se unen al ácido nucleico que pueden utilizarse como TBA o en los mismos según la presente invención. Una vez se conoce la secuencia de aminoácidos de algún ADN, ARN:ADN, ARN u otro ácido nucleico que se une a proteínas, puede prepararse por medios sintéticos una secuencia de ADN apropiada que codifica la proteína, o puede utilizarse una copia de ADNc del ARNm que  
10           codifica la proteína de una fuente de tejido apropiada. Además, pueden obtenerse copias genómicas que codifican la proteína y cortarse y empalmarse los intrones según los métodos conocidos en la técnica. Además, pueden sintetizarse químicamente los TBA.

15           Una vez se ha obtenido la secuencia de codificación apropiada, puede utilizarse la mutagénesis dirigida al punto para alterar la secuencia de aminoácidos codificada para producir proteínas de unión de ácido nucleico mutante que presentan características de unión más deseables que las del ácido nucleico original que se une a la proteína. Como ejemplo de este procedimiento, la secuencia de aminoácidos de las partes de NF-kB que se unen al ADN pueden alterarse de modo que produzcan una molécula de NF-kB que se una  
20           más estrechamente al lugar de unión de NF-kB (véanse los ejemplos a continuación VIH-Detect y VIH-Lock).

25           Para aportar mayor comprensión en este aspecto de la invención, se indican las consideraciones siguientes. Utilizando NF-kB como ejemplo, puede prepararse un TBA que utiliza la molécula NF-kB natural. Sin embargo, debido a que esta molécula está presente en cantidades sumamente pequeñas en las células, y debido a que las subunidades de este ADN que se une a la proteína se han clonado, sería más razonables preparar grandes cantidades del complejo por métodos de ADN recombinante como ya se ha realizado para esta proteína (véase por ejemplo Ghosh [1990] *Cell* 62:1019-1029). NF-kB es un productor pleyotrópico de genes implicado en respuestas inmunitarias, inflamatorias y reguladoras del crecimiento a pruebas de provocación patógenas primarias (víricas, bacterianas o de estrés) o a pruebas de provocación patógenas secundarias (citocina inflamatoria). NF-kB es un ADN dimérico que se une a una proteína que comprende un p50 y una subunidad p65 las cuales se ponen en contacto y se unen a secuencias específicas de ADN. En un estado activado,  
30           los restos NF-kB en el citoplasma celular, acomplejados con un inhibidor específico, I-kB, para formar un heterotrímero citoplásmico. En la activación, se desacompleja el inhibidor, y el dímero p50-p65 se resitúa mediante una señal de localización nuclear específica (NLS) al núcleo de la célula donde puede unirse al ADN y efectuar su papel como activador de transcripción de numerosos genes (véase Grimm y Baeuerle [1993] *Biochem. J.* 290:297-308, para un estudio del estado de la técnica con relación a NF-kB).  
35           40

45           El dímero p50-p65 se une con afinidad picomolar a secuencias que se emparejan con GGGAMTNYCC (SEC. ID. nº 117) de consenso, con afinidades ligeramente diferentes que dependen de la secuencia exacta. No merece la pena que los homodímeros de p50 y p65 se haya observado también que se producen. Estos homodímeros presentan diferentes propiedades bioquímicas así como afinidades ligeramente diferentes de secuencias de unión en el consenso anterior y similares al mismo. Por lo tanto, dependiendo de las características de unión deseadas del TBA, pueden utilizarse un heterodímero p50-p65, un homodímero p50-p50 o un homodímero p65-p65 o fragmentos de los dímeros mencionados

anteriormente.

5 Una manera en la que pueden producirse varios TBA nuevos se muestra  
esquemáticamente en la Figura 9. Las unidades de reconocimiento de ácido nucleico del  
TBA pueden montarse y asociarse con unidades de reconocimiento de ácido nucleico TBA  
similares o disimilares mediante una "chaperona". La chaperona es una estructura en la que  
se construyen varios elementos de reconocimiento de TBA y que proporciona propiedades  
deseables a las unidades de reconocimiento del ácido nucleico. La chaperona está  
10 compuesta por cualquier secuencia que proporcione secuencias de montaje de modo que  
las unidades de reconocimiento de ácido nucleico iguales o diferentes se sitúen en  
asociación próxima y estable entre sí. Así, por ejemplo, en el caso de un TBA diseñado para  
unir íntimamente las TBR de NF-kB, se monta un TBA proporcionando secuencias lambda  
*cro* como secuencias de montaje, unido a las secuencias de unión del ácido nucleico para  
p50 o p65 de NF-kB. Las secuencias de unión del ácido nucleico p50 o p65 están unidas a  
15 las secuencias *cro* en uno de los terminales carboxi o amino de *cro* y uno de los terminales  
carboxi o amino de la unidad de reconocimiento del ácido nucleico del p50 o p65. se  
proporcionan opcionalmente secuencias de unión para permitir el espaciado apropiado de  
las unidades de reconocimiento del ácido nucleico para la unión óptima a la TBR.

20 Las secuencias de montaje, ejemplificadas anteriormente por las secuencias *cro* y CI  
(SEC. ID. nº 104 a nº 108), comprenden cualquier oligopéptido estable que se una natural y  
fuertemente a secuencias similares. Así, en el caso de *cro*, es bien sabido que un dímero de  
*cro* se une a los puntos del operador del bacteriófago lambda (Anderson *et al.* [1981] *Nature*  
290:754-758; Harrison y Aggarwal [1990] *Ann. Rev. Biochem.* 59:933-969). Las unidades  
25 monoméricas de *cro* se asocian íntima y específicamente entre sí. Así, uniendo las  
secuencias de la unidad de reconocimiento de ADN a las secuencias de *cro*, se consigue  
una asociación próxima e íntima.

30 Las secuencias enlazadoras opcionales comprenden cualquier secuencia de  
aminoácidos que no interfiera con el montaje del TBA o la unión del ácido nucleico, y que  
no sea lábil de manera que libere la unidad de reconocimiento del ácido nucleico del TBA  
completo. Es deseable pero no necesario que las secuencias enlazadoras estén unidas  
por enlace covalente a otros componentes del montaje de la unión. La asociación debería  
35 ser específica de manera que ayude al montaje y preparación de los montajes de la unión.  
Ejemplos de dichas secuencias incluyen, pero no se limitan a, dichas secuencias bien  
conocidas como las que se encuentran uniendo varios dominios en proteínas  
estructurales. Así, por ejemplo, en la proteína represora lambda, existe una secuencia de  
enlace entre el dominio de unión del ADN y el dominio de dimerización que es útil para  
40 esta finalidad. Muchas otras de tales secuencias son conocidas y la secuencia exacta de  
las mismas no es crítica para esta invención, con tal que se realice experimentación de  
rutina para asegurar la estabilidad y no interferencia con la unión del ácido nucleico diana.  
Ejemplos de dichas secuencias se proporcionan en la presente memoria como Met Ser y  
las SEC. ID. nº 99 a nº 102. La inserción de puntos específicos de proteólisis conocidos en  
45 estos enlazadores es también parte integrante de la presente invención. La presencia de  
dichos puntos en las secuencias enlazadoras proporcionaría ventajas de preparación,  
permitiendo que diferentes moléculas se ensamblen en la estructura chaperona.

Además de las unidades de reconocimiento del ácido nucleico, secuencias de  
enlace opcionales y secuencias de montaje, los nuevos TBA de la presente invención

opcionalmente presentan asimetría o secuencias de TNA PILOT y una o más unidades OSA. Para estimular o impedir determinadas asociaciones deseables o indeseables se proporcionan secuencias con asimetría. Por ejemplo, en caso de que se desee un TBA con unidades de reconocimiento de ADN p50 homodimérico, se proporcionan secuencias con asimetría para destruir la asociación más fuerte naturalmente de las subunidades p50 de NF-kB y las subunidades p65, aunque no se destruyan las secuencias de montaje procedentes de llevar subunidades p50 juntas. Ejemplos de dichas secuencias se proporcionan en la presente memoria como las SEC. ID. nº 85 a 92 y las SEC. ID. nº 105 y nº 106.

En una configuración diferente, las secuencias de la subunidad p50 de NF-kB se ponen en asociación íntima con las secuencias de la unidad de reconocimiento del ADN del factor de transcripción SP1. Esto es deseable en caso de que un motivo de la unión NF-kB/SP1 sea significativo, como en la LTR del VIH donde se sabe que existen un motivo de por lo menos seis puntos de reconocimiento de la proteína de unión al ADN, dos NF-kB, tres SP1 y una secuencia TATA. Dado que también se sabe que el segundo punto de NF-kB y el primer punto de SP1 son significativos para la regulación de la transcripción del VIH (Perkins *et al.* [1993] *Embo J.* 12:3551-3558), esta configuración específica de TBA es útil no solamente en la detección del VIH, sino como terapéutico o profiláctico contra las infecciones por el VIH (véase a continuación). De modo similar, la zona de control larga (LCR) del papilomavirus humano puede utilizarse como zona de control clave para sondear según este método.

A la vista de los diferentes elementos que pueden asociarse, modo casete, según este método de formación de TBA, se produce una variedad esencialmente ilimitada de TBA. En la Figura 10, una serie de diferentes moléculas, denominadas "VIH-Detect I-IV" se ejemplifican en las que "CHAP" indica la chaperona, "nfkb" indica subunidades NF-kB, "sp1" indica la unidad de reconocimiento del ácido nucleico del factor de transcripción SP1, y "TATA" indica un dímero de la unidad de reconocimiento del ADN de una proteína de unión al ADN con la secuencia TATA (TBP), también conocida como proteína de unión a TATA, o TBP. Estas configuraciones se ejemplifican con más detalle a continuación y son todas partes integrantes de la presente invención.

En otra configuración incluso, la estructura modular mostrada en la Figura 9 se adapta a la detección y/o tratamiento o profilaxis de un patógeno completamente diferente. En la Figura 11, de modo similar a las las moléculas "VIH-detect I-IV" descritas anteriormente, se produce una serie de moléculas "HPV-Detect I-IV". En esta forma de realización, se aprovecha las propiedades de unión del ADN de la proteína E2 del papilomavirus humano (HPV). Además, se aprovechan las funciones de SP1 y TBP proporcionando unidades de reconocimiento de ADN específicas adaptadas para unir estas secuencias en el genoma del HPV. En la formación de los TBA específicos para E2 para su utilización en la detección de la infección por HPV, puede ser deseable utilizar alguna de las SEC. ID. nº 75 a nº 84 o nº 93 a nº 98 como unidades de reconocimiento de ADN de E2. Un TBA que contiene un dominio de unión del ADN al dímero E2 bovino y al dímero E2 humano puede ser particularmente útil.

Varias secuencias descritas anteriormente pueden unirse químicamente utilizando materiales de partida de oligopéptido puro, o pueden unirse por aporte de ácidos nucleicos recombinantes que codifican, mediante el código genético bien conocido, varios

subelementos. En el caso de la producción recombinante, el enlace de las secuencias que codifican *cro* con las secuencias de unidades de reconocimiento de ácido nucleico para formar los TBA presenta ventajas porque no solamente *cro* actúan como secuencias de montaje en la chaperona, también actúa para dirigir el plegamiento apropiado de los elementos de reconocimiento del ácido nucleico. Secuencias modelo para las chaperonas se proporcionan en la presente memoria como SEC. ID. nº 104 a nº 108. Además, en caso en que se deseen estructuras de orden superior que comprenden múltiples lugares de unión, como en un TBA pentamérico, NF-kB/NF-kB/SP1/SP1/SP1, el diseño apropiado de las secuencias con asimetría permite preparar tales estructuras.

En el modo anterior, los TBA que se preparan se unen a sus lugares de unión afines con gran afinidad. Por ejemplo, los componentes de unión del ADN del NF-kB de los TBA de la Figura 10 es de esperar que se unan a VIH-LTR con una afinidad comprendida entre  $10^{-8}$  y  $10^{-12}$  molar. Se proporcionan secuencias útiles como unidades de reconocimiento de ADN tales como SEC. ID. nº 63 a nº 71, nº 73 a nº 84, nº 93 a nº 98 y nº 104 a nº 108 y se ejemplifican con más detalle a continuación.

A la vista de la descripción siguiente del montaje dirigido de las proteínas de unión del ácido nucleico que utilizan secuencias de montaje y asimetría (o pilotaje), los expertos en la materia reconocerán que un método generalmente aplicable para montar estructuras proteicas es proporcionado por la presente invención. La generalidad de este método se demuestra más por consideración, a título de ejemplo adicional, de la utilización de una interacción anticuerpo-epítipo en el montaje de las estructuras deseadas. A modo de especificidad, puede montarse una estructura proteica que se une al ADN uniendo una subunidad p50 de NF-kB a un antígeno, tal como una hormona estimulante de melanocitos (MSH) circular (mediante enlaces disulfuro). Esta molécula pro-MSH puede unirse a continuación mediante un anticuerpo anti-MSH para proporcionar un nuevo montaje de unión del ácido nucleico, actuando el antígeno y el anticuerpo como secuencias de montaje.

La estructura modular proporcionada por la Figura 9 pone de manifiesto que puede montarse una gran variedad de TBA utilizando diferentes combinaciones de componentes. Así, las formas de realización representativas de esta estructura general se proporcionan como SEC. ID. nº 109 a nº 116.

7. Montajes de unión al refuerzo (BBA) y su preparación. Un BBA puede ser cualquier sustancia que se una a una BBR específica formada por hibridación de los PNA y BNA específicos, incluyendo cuando múltiples BNA (hasta e incluyendo "n" BNA, es decir,  $BNA_n$ , en el que "n" es teóricamente  $0-\infty$ , pero prácticamente está comprendido entre 1 y 100) se polimerizan en el PNA para la amplificación de señal, con la condición de que BBA debe tener por lo menos las siguientes propiedades:

- (a) El BBA debe unir las BBR de manera que sea muy específico para la BBR de interés. Es decir, el BBA debe discriminar entre las BBR presentes en el híbrido PNA-BNA y las secuencias dobles similares en los híbridos BNA-CNA u otros CNA. Por lo tanto, incluso cuando se produce un solo emparejamiento de bases o de diferencias de configuración con o sin emparejamientos de bases en la producción del híbrido PNA- $BNA_n$  o PNA- $BNA_n$ -HNA, el BBA debe unir el híbrido con una avidéz suficientemente baja tal que en el lavado el complejo TBA-TNA-PNA- $BNA_n$ , el BBA se desplace de

las secuencias del CNA pero no de las secuencias de la BBR.

- 5 (b) El TBA debe unir con avidez la(s) BBR(s). Generalmente se consideran suficientes las afinidades de unión comprendidas en el intervalo entre  $10^{-5}$  y aproximadamente  $10^{-9}$  o superiores.

10 Ejemplos de BBA incluyen, pero no se limitan a *cro*, y la proteína represora del bacteriófago lambda, Cl. Además, véase la Patente US nº 4.556.643, que sugiere otras secuencias de ADN y proteínas de unión específicas tales como represores, histonas, enzimas modificadoras del ADN y proteína activadora génica del catabolito. Véase también la patente EP 0 453 301, en la presente memoria, que sugiere una multitud de proteínas de unión específicas para la secuencia nucleotídica (NSSBP) tal como el represor de tetraciclina, el represor lac y el represor de triptófano. Se ha reconocido en la técnica que cada uno de estos BBA se une a secuencias específicas de ácido nucleico conocido y las afinidades de estas interacciones son conocidas. Naturalmente, el método de la presente invención no se limita a la utilización de estos BBA conocidos. A partir de la presente publicación, cualquier experto podría aplicar fácilmente la utilización de nuevos BBA que presentan por lo menos las propiedades requeridas indicadas anteriormente en el presente método.

20 Ejemplos de nuevos BBA útiles según este aspecto de la invención incluyen nuevas proteínas basadas en el motivo de un conocido ADN o ARN o proteína de unión ADN:ARN tal como *cro* o la proteína del represor  $\lambda$  Cl. Preferentemente, tales modificaciones se hacen para mejorar la manipulación de estos componentes de la invención. Así, puede ser deseable añadir una elevada concentración de *cro* a un ensayo. Una de las cualidades negativas de *cro* es que a altas concentraciones, la unión de *cro* a su ADN diana entra en competencia con las interacciones *cro-cro*. Así, por ejemplo, puede producirse una *cro* chaperonada o mutada que no presenta esta anomalía. Ejemplos de dichas chaperonas alteradas son las SEC. ID. nº 105 a nº 106 y nº 108. Los métodos conocidos en la técnica, tales como la producción de nuevas proteínas de unión a la diana que utilizan poblaciones variadas de ácidos nucleicos y selección de bacteriófagos que se unen a determinadas dianas preseleccionadas (es decir, la denominada tecnología de presentación del fago, véase la exposición anterior para la producción de nuevos TBA) pueden utilizarse para producir tales BBA nuevos así como los TBA nuevos mencionados anteriormente.

35 Cuando el BBA es una proteína, o un complejo de proteínas, debe reconocerse que puede utilizarse cualquiera de los numerosos métodos de rutina en la técnica para producir el BBA. El BBA puede aislarse a partir de su medio natural en la naturaleza, o si esto no es práctico, producirse por técnicas habituales de la biología molecular. Así, por ejemplo, la secuencia de la proteína *cro* es conocida y puede utilizarse cualquier clon molecular de bacteriófago lambda para obtener ácidos nucleicos apropiados que codifican *cro* para la producción recombinante de la misma. Además, los TBA descritos en la presente memoria pueden utilizarse como BBA, con la condición de que se utilicen diferentes TBA para unir las TBR y BBR.

45 8. Utilización de los BBA y las BBR para localizar y ampliar la localización de los complejos PNA-TNA-TBA (véase la Figura 8). En una forma de realización de la presente invención, se utiliza la unión muy específica y sumamente íntima de los TBA compuestos

5 por componentes que se unen al ácido nucleico para producir un ensayo en *sándwich* de ácido nucleico ampliable. Según un aspecto de esta forma de realización, se recubre un soporte sólido con un primer TBA que crea un TBA inmovilizado. En solución, un PNA y un TNA se ponen en contacto en condiciones de hibridación y a continuación se ponen en contacto con el TBA inmovilizado. Únicamente se conservan aquellas interacciones PNA-TNA que forman la TBR específica reconocida por el TBA inmovilizado durante el lavado de la superficie sólida que se une al complejo TBA-TBR.

10 La detección del enlace TBR se realiza mediante la unión de los ácidos nucleicos de refuerzo, los BNA, a las 1/2 BBR presentes en los PNA en condiciones de hibridación. De esta manera, incluso si solamente un solo complejo TBA-TBR se une al TBA inmovilizado, una señal amplificada, grande puede producirse polimerizando los múltiples BNA al TNA inmovilizado. Cada BNA que se une al TNA forma una BBR que puede unirse mediante los BBA que, igual que los TBA inmovilizados en la superficie sólida, pueden seleccionarse por su unión muy íntima y específica a estructuras de ácido nucleico específicas. Así, según la presente forma de realización, el TBA inmovilizado puede contener la fracción de unión del ADN de NF-kB, que se une muy específica e íntimamente a los lugares de unión de NF-kB formados durante la hibridación del TNA y PNA para formar dicho punto.

20 Debido a que es muy conocido que existen lugares de unión a NF-kB tanto el genoma humano normal como en las repeticiones terminales largas del virus de inmunodeficiencia humano (VIH), la presente invención proporciona un método de discriminación entre los puntos humanos "normales" y los puntos presentes en las células debido a la infección por el VIH. Por consiguiente, en una prueba diseñada para determinar la presencia o ausencia del ADN del VIH en una muestra de ADN humano, pueden observarse lugares de unión a NF-kB del VIH como el TNA, y pueden observarse lugares de unión a NF-kB humano normal como CNA. Según el método de la presente invención, la discriminación entre estos TNA y los CNA se realiza aprovechando el hecho de que en la LTR del VIH, existen dos lugares de unión a NF-kB, seguidos de tres puntos de SPI (véase, por ejemplo, Koken *et al.* [1992] *Virology* 191:968-972), mientras que los lugares de unión a NF-kB celular con la misma secuencia no se encuentran uno detrás del otro.

35 En los casos en los que el TNA contiene más de una 1/2 TBR y sea deseable continuar las aplicaciones terapéuticas y profilácticas de los TBA, puede ser deseable utilizar más de un TBA, cada uno con la capacidad de unir una TBR en el complejo TNA-PNA. En este caso, puede presentar ventajas seleccionar, como componentes de los TBA, dominios de unión al ADN o de unión al ARN con menor afinidad para su TBR que el dominio de unión al ADN o al ARN natural. Dado que los TBA que están implicados en la unión a múltiples TBR pueden montarse juntos antes de la unión a sus TBR o montarse juntos después de la unión a sus TBR, los TBA aislados no bloquearán las correspondientes TBR en otros genomas o el genoma diana a menos que las TBR sean capaces parcialmente de unirse al complejo TBA montado. Una característica del montaje multimérico de los TBA que se reivindica específicamente en la presente memoria como parte de la presente invención es que dicho montaje multimérico es de esperar que tenga una afinidad muy reducida para un solo punto en el TNA. Sin embargo, ya que la unión ha aumentado drásticamente con relación a cualquier TBA, el complejo TBA sería de esperar que no compita por la unión de ninguna TBR aislada con las proteínas naturales

correspondientes *in situ* sino que se una íntimamente a las secuencias en el híbrido PNA-TNA que contiene las TBR para cada uno de los componentes de unión al ácido nucleico montados en el TBA. El complejo TBA debería montarse y los enlazadores ajustarse en los TBA aislados de modo que permitan a las zonas de unión al ácido nucleico contenidas en el complejo TBA alcanzar simultáneamente estas dianas y unirse a ellas.

Una vez se han formado los híbridos TNA-PNA y se han puesto en contacto con el TBA inmovilizado, el ácido nucleico no unido se lava en la superficie inmovilizada y se detectan los híbridos inmovilizados. Esto se realiza en cualquiera de varias maneras. En un aspecto de la presente invención, el PNA se marca con un OSA, tal como un radionucleido, perlas coloreadas o una enzima capaz de formar un producto de reacción coloreado. Asimismo, además de tener una o más 1/2 TBR, el PNA puede también contener por lo menos una 1/2 BBR. Las secuencias de 1/2 BBR se seleccionan de modo que sean complementarias con las secuencias 1/2 BBR exclusivas en las BNA. En la forma de realización descrita anteriormente, por ejemplo, cuando el TBA es NF-kB y el TBR formado durante la hibridación TNA-PNA es uno o más lugares de unión a NF-kB, las 1/2 BBR pueden proporcionar secuencias hibridables (es decir, monocatenarias, complementarias) de los operadores izquierdo o derecho del bacteriófago lambda (véase, por ejemplo, Ptashne [1982] *Scientific American* 247:128-140, y referencias citadas en la misma para las secuencias de estos operadores. Estos pueden polimerizarse sobre las 1/2 BBR del PNA de modo vectorial (véase las Figuras 2 y 3) proporcionando hasta "n" BBR, y cada BBR forma un lugar de unión *cro*. *cro* marcada con enzimas, radioactividad o de otro modo, se pone en contacto con el complejo TBA-TNA-PNA-(BNA)<sub>n</sub>. De este modo, se produce una señal muy selectiva y amplificada. La señal producida utilizando un PNA con una sola 1/2 TBR indica el éxito del ensayo al conseguir la unión TBA-TBR y la polimerización de los BNA para producir la señal de los puntos celulares (es decir de los CNA). La ausencia de señal cuando se utiliza un TBA dimerizado indica que en el TNA, no existían LTR del VIH ya que no estaban presentes lugares de unión al NF-kB dobles. Por otra parte, la presencia de la señal utilizando el dímero NF-kB indica infección por VIH. Como ejemplo específico de la descripción anterior de esta forma de realización de la invención, véase el Ejemplo 6 que describe un kit de ensayo de VIH.

Naturalmente, los expertos en la materia reconocerán que la descripción siguiente se somete a varias modificaciones en la selección de los PNA, TNA, TBA, BNA y BBA. Además, en los sistemas aparte del VIH, los expertos en la materia reconocerán que podría aplicarse igualmente el método general descrito anteriormente. Sin embargo, estas otras aplicaciones pueden ser más sencillas que el método descrito anteriormente ya que los TBA utilizados puede que no reconozcan ningún punto celular normal y por consiguiente recurrir a la dimerización o a otros métodos de discriminación entre los TNA y los CNA puede ser menos crítico. Al diseñar sondas y montajes de unión para estos otros sistemas, el especialista experto se guiará por los principios y consideraciones siguientes.

En la forma de realización descrita anteriormente, el recurso de utilizar las fracciones que se unen al ADN de la proteína NF-kB como elementos de unión de reconocimiento de TBA y NF-kB como las TBR consiste en que estos elementos forman un importante "punto de control" para la replicación del VIH. Es decir, es sabido que se requiere VIH para utilizar NF-kB como característica crítica en este ciclo vital replicativo. Similares puntos de control para otros patógenos se seleccionan y se utilizan como base para la detección según los métodos descritos en la presente memoria.

5 A partir de la descripción anterior de las características generales de la presente invención y del modo de su operación, un experto en la materia reconocerá que existe una multiplicidad de modos específicos de poner en práctica la presente invención. A modo de ejemplo, el método de la presente invención es adaptable a un método y a los dispositivos que utilizan kits de ensayo cromatográficos descritos en las patentes US nº 4.690.691 y nº 5.310.650 (patentes '691 y '650). En estas patentes, se utilizó un medio poroso para inmovilizar un TNA o una sonda de captura, y se utilizó un disolvente para transportar una fase móvil que contiene un PNA marcado, si el TNA estaba inmovilizado, o el TNA, si la sonda de captura estaba inmovilizada, en la "zona de captura". Una vez el TNA estaba unido en la zona de captura, bien inmovilizándolo directamente o por captura, se cromatografió un PNA marcado mediante la zona de captura y se detectó algún marcador unido.

15 Adaptando la presente invención a dicho sistema proporciona la mejora de la utilización de un montaje de unión a la diana en la zona de captura y por consiguiente, la captura solamente de las secuencias de TBR perfectamente emparejadas u otras conformaciones de ácido nucleico que representan las TBR específicamente unidas por el TBA en los dobles TNA-PNA en virtud de la discriminación sensible descrita anteriormente por el TBA entre los TNA y los CNA.

20 Una vez los híbridos de TNA-PNA se han unido al TBA inmovilizado, se amplifica la señal añadiendo los BNA o cromatografiando los BNA por la zona de captura. Por último, puede amplificarse más la señal añadiendo los BBA o cromatografiando los BBA marcados por la zona de captura. De este modo, la facilidad de realizar las etapas de análisis descrita en las patentes US nº 4.690.691 y nº 5.310.650 se mejora en la presente memoria proporcionando la capacidad adicional para aumentar la especificidad y, mediante la amplificación, la sensibilidad del método descrito en estas patentes.

30 Los expertos en la materia reconocerán también que el método de la presente invención es adecuado para realizarse en placas de microvaloración o de forma automática. La utilización de máquinas que incorporan el método de la presente invención por consiguiente caen de forma natural dentro del alcance de la presente publicación y de las reivindicaciones adjuntas a la misma. Así, por ejemplo, la presente invención es adaptable a la utilización en instrumentos tales como el analizador de sobremesa IMx de Abbott Laboratories (Abbott Park, IL). El IMx se diseña actualmente para realizar tanto inmunoanálisis de polarización fluorescente (FPZA, véase Kier [1983] *KCLA* 3:13-15) como inmunoanálisis enzimático de micropartículas (MEZA, véase *Laboratory Medicine*, vol. 20, nº 1, enero de 1989, págs. 47-49). El método MEZA se transforma fácilmente en un método de detección de ácidos nucleicos utilizando la presente invención mediante la utilización de un TBA como molécula de captura recubierta en una micropartícula de tamaño submicrónico (<0,5 µm de promedio) suspendida en solución. Las micropartículas recubiertas con TBA se pipetea en una celda de reacción. El IMx pipetea a continuación la muestra (PNA-TNA hibridado) en la celda de reacción, formando un complejo con el TBA. Después de un periodo de incubación apropiado, la solución se transfiere a una matriz de fibra de vidrio inerte para que las partículas tengan una fuerte afinidad y para que se adhieran las micropartículas. Bien antes o después de filtrar la mezcla de reacción a través de la matriz de fibra de vidrio, se añaden los BNA y los BBA, o se utilizan otros medios de amplificación y detección de la señal los cuales dependen de la formación

específica de los híbridos TNA-PNA. El complejo inmovilizado se lava y el material no unido circula a través de la matriz de fibra de vidrio.

5 Los complejos unidos se detectan mediante los BBA marcados con fosfatasa alcalina o los BBA marcados de otro modo (con radioactividad, enzimas o fluorescencia). En el caso de los BBA marcados con fosfatasa alcalina, puede añadirse el sustrato fluorescente fosfato de 4-metil umbeliferil o un reactivo similar. Alternativamente, la enzima puede derivarse marcando directamente los BBA con este agente o uno similar. En cualquier caso, la señal fluorescente u otra es proporcional a la cantidad de híbridos PNA-TNA presentes.

10 La fluorescencia se detecta en la superficie de la matriz mediante un fluorómetro de superficie frontal como describe el fabricante del IMx. Con ajustes menores que pueden realizarse en la experimentación de rutina para optimizar un instrumento tal como el IMx para la hibridación de ácido nucleicos y las interacciones ácido nucleico-TBA, la presente invención es completamente adaptable al análisis automático de muestras de TNA.

20 9. Otras aplicaciones para diagnóstico de la presente invención. Aunque la descripción anterior permite la utilización de la presente invención en numerosos modos diferentes, muchas utilidades adicionales de la presente invención son fácilmente apreciadas, por ejemplo, en un sistema con retardo de movilidad.

25 En esta forma de realización de la invención, una mejora de la prueba de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) bien conocida se realiza de la manera siguiente (véanse las Figuras 12a y 12b):

30 Se fragmenta una muestra de ADN, bien mediante escisión al azar o mediante tratamiento con endonucleasa de restricción específica. El ADN en la muestra se corta y empalma a continuación en dos alícuotas iguales y se añade un TNA específico a la primera alícuota pero no a la segunda. La primera y segunda alícuotas se electroforizan a continuación en un gel de acrilamida o de agarosa, y el patrón de las bandas de ADN (ya sea visualizado mediante la unión del bromuro de etidio o porque se marque radioactivamente antes de la electroforesis se compara a continuación para las dos alícuotas. Los fragmentos de ADN que tienen lugares de unión a los que el TBA es específico se retardan en su migración a través del medio electroforético. Utilizando un TBA apropiado, cualquier número de ADN u otras secuencias de ácido nucleico pueden transportarse de esta manera.

40 En una modificación del EMSA descrito anteriormente, se hibrida el TNA fragmentado con un PNA y se fracciona en una primera dimensión. El ADN fraccionado se hace reaccionar a continuación con un TBA apropiado y se anota el cambio de movilidad de los fragmentos de ADN. La mejora del retardo es posible añadiendo los BBA tal como se describió anteriormente. (Véase, por ejemplo, Vijg y referencias citadas en la presente memoria para las técnicas conocidas de electroforesis de ácido nucleico en dos (2) dimensiones, a las que puede aplicarse el presente método).

45 Los ejemplos siguientes se proporcionan para guiar más a los expertos en la materia sobre los métodos de la puesta en práctica de la presente invención. Las técnicas

de ADN recombinante normalizadas dadas a conocer en Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, y textos más recientes no se dan a conocer ya que actualmente están comprendidos dentro de la experiencia de cualquier especialista.

5

### **EJEMPLO 1 – Preparación y marcado de los PNA**

10 Los ácidos nucleicos sonda, PNA, pueden prepararse por métodos bien conocidos en la técnica. Así, los PNA de polinucleótidos monocatenarios de secuencia definida pueden prepararse por síntesis química en fase sólida según Merrifield. Los PNA pueden prepararse por síntesis automática utilizando tecnología disponible en el mercado, tal como resinas y máquinas producidas o comercializadas por Applied Biosystems, ABI, u otros fabricantes. Alternativamente, se sintetizan *in vivo* secuencias de PNA específicas por los métodos conocidos del ADN recombinante, por ejemplo clonado un PNA doble en un vector que puede replicarse en *E. coli*, pueden prepararse grandes cantidades de PNA doble. Los multímeros del PNA pueden clonarse en el vector de modo que por cada mol de vector, se liberan varios moles de PNA en la digestión del vector con un fragmento de restricción que flanquea la secuencia de PNA. Después de la síntesis o producción recombinante, se purifican los PNA por métodos bien conocidos en la técnica tales como la electroforesis en gel o la cromatografía líquida a alta presión (HPLC). Si el PNA se produce en forma doble, antes de la utilización en un ensayo de hibridación para la detección de secuencias de ácido nucleico diana, las cadenas del PNA se separan calentando o por otros métodos conocidos en la técnica.

25

30 La secuencia específica de bases en el PNA se selecciona para reflejar la secuencia que va a detectarse en un TNA, con la condición de que, según la presente invención, el PNA contenga una secuencia de 1/2 TBR, que es la que durante la hibridación del PNA y TNA, forma una TBR. Ya que existe un número esencialmente ilimitado de tales secuencias conocidas en la técnica, la selección de la secuencia de PNA es adecuada para la selección por el investigador experto para cualquier aplicación dada. La secuencia de la LTR del VIH es una secuencia tal, que en la hibridación de un PNA que codifica las fracciones de la LTR con los TNA que codifican la LTR del VIH, se forman las TBR capaces de unirse al NF-kB o las proteínas de unión al ADN de SP1.

35

40 Además de las secuencias que formarán un TBR en la hibridación, el PNA también puede contener una 1/2 BBR. Esta secuencia es la que, en la hibridación con un ácido nucleico de refuerzo, BNA, forma una BBR que puede unir un BBA. El BBA es preferentemente una proteína de unión al ADN que tiene gran afinidad para la secuencia de la BBR.

40

45 En este ejemplo particular, la hibridación entre un PNA que tiene como 1/2 TBR, la SEC. ID. nº 4 y, en el extremo 3' de esta secuencia, una secuencia de 1/2 BBR mostrada como SEC. ID. nº 35. El PNA que codifica estas secuencias se utiliza sin marcar o está marcado con un isótopo radioactivo tal como P<sup>32</sup>, S<sup>35</sup>, o un isótopo similar, según los métodos conocidos en la materia. Alternativamente, el PNA se une a una perla de entre 0,01 a 10 µm, que puede estar coloreada para detección visual fácil. Este marcador forma el OSA tal como se describe en la memoria. Esta sonda se hibrida con las secuencias LTR del VIH para formar una TBR que se une a NF-kB. Además, el PNA se hibrida con las

45

BNA que tienen una 1/2 BBR complementaria para formar un operador izquierdo del bacteriófago lambda que une bien *cro* o las proteínas represoras lambda.

De manera similar a la descrita anteriormente, se utilizan los PNA en los que la 1/2 TBR es cualquiera de las SEC. ID. nº 5 o SEC. ID. nº 7 a nº 34, y una 1/2 BBR, tal como la SEC. ID. nº 35 o la SEC. ID. nº 36 está bien en el extremo 3' o en el extremo 5' de la 1/2 TBR.

## **EJEMPLO 2 – Preparación y marcado de los BNA**

De manera similar a los métodos descritos en el Ejemplo 1 para la preparación y marcado de los PNA, se preparan los BNA y se marcan según los métodos conocidos en la técnica. Tal como se describe en la patente US nº 4.556.643, incorporada en la presente memoria como referencia (véase en particular el Ejemplo 1), las secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias de unión del ácido nucleico específicas pueden ser producidas en masa por clonación en un vector replicable. Además, de manera similar a esta publicación, las secuencias de 1/2 TBR y 1/2 BBR pueden producirse colinealmente de este modo, con la distinción, sin embargo, de que según la presente invención, la propia secuencia de 1/2 TBR forma un punto de reconocimiento del componente que se une al ácido nucleico y la 1/2 BBR, aunque al formar un punto de reconocimiento del componente que se une al ácido nucleico, también proporciona un método de amplificación de la señal producida en la unión de la 1/2 TBR a las secuencias complementarias en el TNA proporcionando la polimerización de los BNA en el PNA unido al TNA. Para permitir esto, se proporciona una secuencia tal como la SEC. ID. nº 35, que codifica el operador izquierdo del bacteriófago lambda, con las secuencias adicionales de modo que se crea una secuencia sobresaliente en uno o ambos extremos del BNA durante la hibridación con el PNA.

Como ejemplo específico, las SEC. ID. nº 40 a nº 43 proporcionan la polimerización vectorial de los BNA en un TNA. En este ejemplo, la SEC. ID. nº 40 codifica dos 1/2 TBR que se hibridarán con dos 1/2 TBR en un TNA para formar dos lugares de unión a NF-kB, aunque al mismo tiempo proporcionando una 1/2 BBR del operador izquierdo del bacteriófago lambda, que además se termina en el extremo 3' con el punto de reconocimiento para la enzima de restricción *Pst*I. La adición del BNA, SEC. ID. nº 41, con la 1/2 BBR complementaria de la 1/2 BBR en el PNA, SEC. ID. nº 40, completa la BBR aunque al mismo tiempo que completa el punto de reconocimiento *Pst*I, dejando una cuarta base saliente para la hibridación con los BNA adicionales. Por consiguiente, se añade la SEC. ID. nº 42 que tiene una secuencia de cuatro pares de bases en el extremo 3' que es complementaria de la saliente de cuatro bases que permanece desde la hibridación de las SEC. ID. nº 40 y nº 41. Además, se proporciona la SEC. ID. nº 42 con una secuencia de cinco bases en su extremo 5' que forma parte de una secuencia de reconocimiento de *Bam*HI. El polímero en desarrollo de los BNA se continúa prolongando mediante la adición de la SEC. ID. nº 43 del BNA, que es complementaria de la SEC. ID. nº 42, que completa la BBR aunque al mismo tiempo que completa el punto de reconocimiento de *Bam*HI y que deja una saliente de cuatro bases que puede hibridarse más con los BNA que tienen secuencias complementarias. De este modo, los BNA pueden hibridarse extensamente a fin de ampliar en gran medida la señal de un escenario de hibridación de PNA-TNA.

5 Como con los PNA descritos en el Ejemplo 1, los BNA pueden utilizarse en forma no marcada o pueden marcarse según los métodos conocidos en la técnica y descritos en el Ejemplo 1. Se apreciará asimismo que, en lugar de producir el polímero de BNA por adición sucesiva de los BNA al complejo PNA-TNA, el polímero BNA pueda formarse previamente y añadirse directamente al complejo PNA-TNA. Un método sencillo para formar previamente dicho polímero BNA incluye la producción recombinante de un vector en el que los multímeros del BNA se proporcionan con una única secuencia de restricción en uno de los extremos del polímero. Este polímero de los BNA que contiene múltiples BBR se corta del vector y se hibrida a una 1/2 BBR monocatenaria que permanece en el PNA en la hibridación del PNA y el TNA. Esto se realiza proporcionando una secuencia monocatenaria en el PNA complementario con uno saliente producido en el polímero BNA cuando se escinde del vector de producción.

### 15 **EJEMPLO 3 – Producción de los HNA y su utilización para coronar los polímeros de BNA**

20 Los HNA de la presente invención se producen según los métodos conocidos en la técnica para la producción de polinucleótidos tal como se describe en los Ejemplos 1 y 2 para los PNA y BNA. En la producción de los HNA, sin embargo, la secuencia del HNA se diseña específicamente de modo que una parte sustancial del HNA forma un palíndromo autocomplementario al formar una horquilla, mientras que al mismo tiempo, que deja una forma monocatenaria suficientes bases que pueden hibridarse con las secuencias monocatenarias en la cadena en desarrollo de los BNA descritos en el Ejemplo 2.

30 En este Ejemplo, se proporciona un HNA de SEC. ID. nº 44 para coronar la ampliación de los BNA en el PNA en el Ejemplo 2 después de la adición del BNA, SEC. ID. nº 43. Esto se realiza porque la SEC. ID. nº 44, aunque tiene una secuencia palindrómica que forma una horquilla estable, también tiene una secuencia en el extremo 5' del HNA que completa la secuencia de *Bam*HI formada por la hibridación de la SEC. ID. nº 42 y la SEC. ID. nº 43. De forma natural, la terminación del polímero después de la adición de solo 3 BNA es con objeto de simplicidad en la demostración de la invención. Tal como se describió anteriormente, esta polimerización puede continuarse esencialmente de manera indefinida para amplificar la señal del episodio de hibridación de PNA-TNA. Una vez que el HNA hibrida a la cadena en crecimiento de los BNA, el polímero se corona y no es posible ya la ampliación del polímero.

### 40 **EJEMPLO 4 – Preparación de los TBA y los BBA, marcado e inmovilización de los mismos**

45 Los TBA y BBA que pueden utilizarse según la presente invención incluyen cualquier sustancia que pueda unirse específicamente a las TBR y BBR formadas por la hibridación de los PNA, TNA y BNA. La utilización de las proteínas de unión al ADN forma un ejemplo de tales sustancias.

Para este ejemplo, el TBA es el dímero de la parte de p50 que se une al ADN, y el BBA es la proteína *cro* lambda. Estas proteínas pueden producirse según los métodos

conocidos en la técnica. Los genes para ambas de estas proteínas se han clonado. Así, estas proteínas se producen de manera recombinante y se purifican según los métodos conocidos en la técnica. Además, estas proteínas están marcadas, ya sea con un radioisótopo, tal como yoduro radioactivo, o con una enzima, tal como betagalactosidasa o peroxidasa de rábano picante, o con un colorante fluorescente tal como fluoresceína o rodamina, según los métodos bien conocidos en la técnica. Además, uno de los dos o ambos TBA o BBA pueden inmovilizarse en una superficie sólida tal como la superficie de una placa de microvaloración o la superficie de una perla, tal como una perla coloreada de cualquier diámetro entre 0,01 y 10  $\mu\text{m}$ . Los marcadores en los TBA y BBA pueden ser iguales o diferentes.

En este ejemplo, el TBA que contiene el dominio de unión del ADN al p50 dimérico se marca con rodamina, mientras que el BBA, *cro*, se marca con fluoresceína. Por consiguiente, en la hibridación de los PNA, TNA, BNA y HNA tal como se describe en esta publicación de la patente y en los ejemplos anterior y siguiente, los híbridos de ácido nucleico, si se forman, se ponen en contacto con TBA y *cro* marcados en exceso. La fluorescencia de estos marcadores se mide según los métodos conocidos y, la detección de ambas señales es indicativo de la presencia de secuencias de 1/2 TBR en el TNA. La señal diferencial producida por la fluorescencia del NF-kB y *cro* es una medida del grado al que la polimerización de los BNA en el híbrido PNA-TBA ha producido la amplificación de la señal. La amplificación desde uno a más de mil veces se contempla según el método de la presente invención.

#### **EJEMPLO 5 – Hibridación de dos PNA con un TNA y discriminación entre un TNA y un CNA**

Los PNA, PNA1, SEC. ID. nº 40 y PNA2, SEC. ID. nº 45, se utilizan aproximadamente en un exceso molar de diez veces sobre la concentración de los TNA en una muestra de ensayo. Para este ejemplo, se utiliza como TNA, una LTR del VIH doble aislado, en la que una cadena que tiene la secuencia SEC. ID. nº 37, mostrada en la Figura 7, y la otra cadena que es complementaria a la secuencia mostrada en la Figura 7. Un CNA doble aislado se utiliza también en este ejemplo, una cadena del cual tiene la secuencia como SEC. ID. nº 37, excepto que, en el primer lugar de unión a NF-kB mostrado en la Figura 7, en el centro del lugar de unión, posición 1 en la Figura 7, en lugar de una "T", existe una "A", cuya cadena complementaria se empareja por lo tanto con el PNA de la SEC. ID. nº 40 en esta posición.

La SEC. ID. nº 40 y la SEC. ID. nº 45 se añaden ambas para separar las reacciones, conteniendo la primera el TNA descrito anteriormente y conteniendo la segunda el CNA descrito anteriormente. Las muestras se solubilizan en un tampón de hibridación apropiado, tal como Tris 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM. Las muestras se calientan a aproximadamente 90°C durante aproximadamente cinco minutos para trenzar por separado los TNA y CNA dobles en las muestras y a continuación las muestras se dejan enfriar para permitir que se hibriden las cadenas de los PNA, TNA y CNA.

Una vez la hibridación ha procedido hasta la terminación, que puede determinarse según los métodos conocidos tales como calculando la  $t_{1/2}$  basada en las composiciones básicas y en la temperatura de hibridación según métodos conocidos, el PNA de la SEC. ID.

n° 40 se polimeriza por adición de los BNA como en el Ejemplo 2 y la sonda PNA2 de la SEC. ID. n° 45 se polimeriza con los BNA partiendo del punto de reconocimiento de Sph1 sobresaliente. Después de la adición de los BNA y de un breve periodo de hibridación, las muestras por separado se añaden a perlas recubiertas con NF-kB inmovilizado covalentemente, y el NF-kB permite que se una a algunas TBR formadas en las muestras de TNA y CNA. Después de aproximadamente 15 minutos de unión, las muestras se lavan dos veces con aproximadamente tres volúmenes de un tampón de lavado apropiado, tal como Tris 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, u otro tampón predeterminado que no interfiera con NF-kB, o con la actividad de unión de la proteína del represor CI del bacteriófago lambda. Después de cada lavado, las perlas se dejan sedimentar por gravedad o mediante breve centrifugación. Esto elimina algunos ácidos nucleicos que no presentan un lugar de unión perfecto a NF-kB formado por la hibridación de las secuencias de PNA1 y TNA.

Tras el lavado final, se añade a cada muestra la proteína represora CI del bacteriófago lambda con un isótopo radioactivo, tal como con yodo radioactivo, o marcada con una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante, con perlas coloreadas, o con marcador fluorescente. Las muestras se lavaronn varias veces (aproximadamente 3) con varios volúmenes (aproximadamente 2) de un tampón de lavado apropiado, tal como Tris 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, u otro tampón predeterminado que no interfiera con NF-kB, o con la actividad de unión de la proteína del represor CI del bacteriófago lambda. Después de la última sedimentación o centrifugación, se cuantifica el marcador unido detectando la radioactividad ligada, el color liberado en un ensayo enzimático, el color de las perlas unidas o detección por fluorescencia. Alternativamente, puede añadirse un anticuerpo anti-CI y realizarse un inmunoanálisis o radioinmunoanálisis ligado a la enzima sándwich estándar para detectar el represor ligado. Además, como referencia negativa (fondo), todas las manipulaciones anteriores se realizan una detrás de otra con una muestra en la que las perlas se utilizan sin NF-kB inmovilizado.

Como resultado del ensayo anterior, la referencia y las muestras que contienen CNA presentan asimismo señales bajas mientras que la muestra que contiene TNA presenta una señal muy por encima del fondo.

### **EJEMPLO 6 – Kit de ensayo para la detección del VIH**

- A. Contenidos del kit:**
1. Placa de microvaloración.
  2. 1 mg/ml de solución de NF-kB producido de manera recombinante en solución salina tamponada con tris.
  3. Tubo que contiene los PNA monocatenarios del VIH (una mezcla de olinucleótidos premezclados que codifican dos lugares de unión NF-kB 1/2, es decir una mezcla de las SEC. ID. n° 7 y n° 8).
  4. Tubo que contiene PNA genómico humano monocatenario, SEC. ID. n° 1.
  5. Tubo de nucleasa (*PstI*).

6. Tubo de proteasa.
- 5 7. Tubo que contiene los BNA prepolimerizados, 100 unidades de repetición de bacteriófago lambda  $O_R$ , coronadas con un HNA pero con las 1/2 BBR libres disponibles para la unión a los híbridos PNA-TNA.
8. Tubo de *cro* conjugado con peroxidasa de rábano picante (hrp).
- 10 9. Tubo de sustrato coloreado con hrp.
10. Solución salina tamponada con tris, 100 ml.
11. Bisturí.
- 15 12. Tubos A, B, C, de reacción que contiene cada uno 250  $\mu$ l de agua destilada.
13. Cuentagotas medicinal.

20 **B. Método de análisis:**

- (a) La placa de microvaloración (artículo 1) se recubre con la solución de NF-kB (artículo 2) producido de manera recombinante a una concentración de 1 mg/ml en solución salina tamponada con tris durante la noche a 4°C con balanceo.
- 25 (b) Se extraen tres gotas de sangre del tomador de análisis pinchando un dedo con el bisturí (reactivo 11) y se distribuye una gota de sangre en cada uno de los tubos de reacción A, B y C (reactivo 12).
- 30 (c) En cada tubo se distribuye una gota de solución de proteasa (reactivo 6) con el cuentagotas medicinal (artículo 12) y se agita el tubo y se deja sedimentar durante 5 minutos.
- 35 (d) Se añade una gota de nucleasa (artículo 5) a cada uno de los tubos A-C utilizando el cuentagotas medicinal y los tubos se agitan y se dejan sedimentar durante 10 minutos.
- 40 (e) Se añade una gota del artículo 3 al tubo A (muestra de análisis); se añade una gota del artículo 4 al tubo B (referencia positiva); y se añade una gota de solución salina (artículo 12) al tubo C como referencia negativa. Se calientan los tubos a 50°C en agua caliente y se dejan enfriar a temperatura ambiente durante una hora.
- 45 (f) Mientras se deja que tenga lugar la hibridación en la etapa (d), la proteína en exceso se drena de la superficie y de la placa de valoración, de la etapa (a), y se enjuaga la placa con solución salina tamponada con tris (tubo 10).
- (g) Los contenidos de los tubos A-C de la etapa (e) se transfieren a tres pocillos de la placa de microvaloración y se dejan en reposo durante 1 hora con balanceo.

- (h) Los pocillos de microvaloración que contienen los contenidos de los tubos A-C se enjuagan con solución salina tamponada con tris y se vacían.
- 5 (i) Se añade una gota del artículo 7 a cada pocillo y se deja que se hibride con algunos puntos de 1/2 BBR unidos a la placa, durante una hora, seguido de tres enjuagues con solución salina tamponada con tris.
- 10 (j) Se añade una gota del artículo 8 a cada pocillo y *cro* se deja que se una a algunos de los BNA unidos durante 10 minutos, seguido de cinco lavados de un ml con solución salina tamponada con tris.
- (k) Se añade una gota del sustrato hrp a cada pocillo y se deja desarrollar el color.

**C. Resultados:**

15 Si ambos pocillos A y B presentan desarrollo de color y el pocillo C no, el análisis es válido y el paciente ha sido infectado con VIH. Si solamente el pocillo A presenta desarrollo de color, o si el pocillo C presenta desarrollo de color, el análisis se ha realizado incorrectamente y es inválido. Si los pocillos A y C no presentan desarrollo de color pero el pocillo B sí, el análisis es válido y el individuo no ha sido infectado con el VIH.

20

**EJEMPLO 7 – Producción de varios TBA nuevos**

25 Se preparan nuevos TBA para su utilización según la presente invención de la forma siguiente:

30 (a) NFKB/NF-kB (VIH-Detect I). Un ácido nucleico que codifica cualquiera de las SEC. ID. nº 63 a nº 71 o una proteína que se une al ADN de NF-kB similar, se fusiona, en el marco, a una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de montaje, tal como *cro*, de modo que la secuencia de reconocimiento del ADN de NF-kB es codificada en el terminal amino o carboxi de la secuencia *cro*. Opcionalmente, se proporciona una secuencia enlazadora entre la secuencia de NF-kB y la secuencia de *cro*. En el otro terminal de *cro*, se proporciona opcionalmente una secuencia señal de localización nuclear, tal como la SEC. ID. nº 72. Además, se proporcionan opcionalmente secuencias con asimetría en el terminal *cro* no utilizado por la secuencia de reconocimiento NF-kB. Ejemplos de los TBA completos se presentan a continuación.

35

40 (b) NF-kB/SP1 (VIH-Detect II). De manera similar a la descrita en (a) anteriormente, se prepara una secuencia de codificación recombinante que codifica un dominio de reconocimiento de NF-kB. En un montaje por separado, en lugar de las SEC. ID. nº 63 a nº 72, se incluye la secuencia de codificación para el fragmento de reconocimiento del ADN de SP1. Dicha secuencia debería codificar toda o una parte funcional de la SEC. ID. nº 73, que es la porción del factor de transcripción SP1 que presenta la unión del ADN (véase Kadonaga *et al.* [1987] *Cell* 51:1079-1090). El vector que codifica a NF-kB y el vector que codifica a SP1 se transfectan conjuntamente a continuación en un sistema de expresión apropiado tal como es bien conocido en la técnica. Se añade una unidad de reconocimiento monomérica de NF-kB para completar el dímero de reconocimiento NF-kB después del montaje del SP1 y las unidades de reconocimiento de NF-kB por la chaperona. Las

45

secuencias con asimetría impiden la formación de dímeros de NF-kB o de SP1 y dirigen, en su lugar, la formación de heterodímeros NFkB-SP1 (es decir, VIH-Detect II), que se aíslan a continuación del sistema de expresión (células de mamífero o bacterianas) por métodos conocidos.

5                   (c) SP1/SP1 TBA (VIH-Detect III). Tal como se describe en (b) anteriormente, se prepara un montaje de TBA que codifica a SP1. Sin embargo, solamente este montaje está transfectado en el sistema de expresión, y se incluyen las secuencias de asimetría que permiten la formación de dímeros SP1-SP1.

10                   (d) SP1-TATA (VIH-Detect IV). Como se describe en (b) anteriormente, se produce un TBA recombinante que codifica a SP1. Además, se prepara un recombinante que codifica a TBA que presenta la secuencia de unión, SEC. ID. nº 74, o la secuencia similar que codifica a la unidad de reconocimiento TATA, con secuencias de asimetría complementarias a las incluidas en el montaje que codifica a SP1 TBA. Estos montajes se transfectan conjuntamente y los heterodímeros aislados por métodos normalizados, incluyendo la purificación por afinidad en una columna con ADN que tiene las zonas de unión diana SP1-TATA apropiadas.

20                   (e) SP1-E2 (HPV-Detect I). Se prepara un montaje que codifica a SP1 como en (b) anterior. Se prepara un montaje que codifica a E2 TBA utilizando una secuencia que codifica cualquiera de las SEC. ID. nº 75 a nº 84 y nº 94 a nº 98 que son unidades de reconocimiento de ADN de papilomavirus E2 (véase Hegde *et al.* [1992] *Nature* 359:505-512) o unidades de reconocimiento similares, se prepara y se cotransforma o se cotransfecta con el montaje que codifica a SP1 TBA. Se añade la unidad de reconocimiento de E2 monomérica al dímero de reconocimiento de E2 completo después del montaje de la unidad de reconocimiento E2-SP1 por la chaperona. El heterodímero HPV-Detect I se aísla según métodos conocidos.

25                   (f) E2-E2 (HPV-Detect II). Como se describe anteriormente en (e), se prepara un montaje que codifica a E2 TBA, excepto que las secuencias con asimetría se incluyen lo que permite la formación de dímeros de E2. Los dímeros expresados se aíslan a continuación por métodos conocidos incluyendo por afinidad para un lugar de unión a E2 dimerico en una columna de afinidad para ADN.

30                   (g) E2-TATA (HPV-Detect III). Como se describe anteriormente en (e) y (d), se preparan los TBA que se unen a E2 y TATA (respectivamente), excepto que se incluyen las secuencias con asimetría que potencian la formación de heterodímeros en lugar de homodímeros. Estos montajes se coexpresan a continuación y se aíslan los heterodímeros.

35                   (h) TATA-TATA (HPV-Detect IV). Como se describe anteriormente en (a) y (d), se prepara el montaje que codifica a TBA que se une a TATA utilizando secuencias con asimetría que estimulan esta formación de heterodímeros y se aísla el homodímero.

40                   (i) Otros TBA. Como se describe anteriormente para VIH y para los TBA de HPV, los TBA para cualquier patógeno dado o el estado patológico pueden producirse identificando proteínas que se unen al ADN específico y que forman un montaje de expresión que utiliza enlazador, montaje y secuencias con asimetría apropiados.

45

### **EJEMPLO 8**

De manera similar al ensayo descrito en el Ejemplo 5, se produce un ensayo más severo utilizando la proteína de unión doble NF-kB-SP1 según el Ejemplo 6. Por consiguiente, las sondas mostradas en la Figura 7 y utilizadas en el Ejemplo 5 pueden prolongarse para reducir la distancia intersonda y de este modo reducen la flexibilidad del ADN en el TNA.

### **EJEMPLO 9 – Producción de los TBA de “orden superior”**

Mediante la utilización apropiada de secuencias con asimetría, se producen los TBA que son dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros o hexámeros de unidades de reconocimiento de ADN específico. De esta manera, se produce un TBA hexamérico preparando un primer TBA dimérico de NF-kB p50 que utiliza secuencias con asimetría que permiten la formación del dímero. Además, las secuencias con asimetría permiten la tetramerización del dímero p50 con un dímero SP1-SP1. Por último, las secuencias con asimetría adicionales dirigen la hexamerización con un dímero que presenta secuencias de localización nuclear. Esto se realiza incorporando, por ejemplo, secuencias con asimetría de insulina, que en la naturaleza forma hexámeros. Esta formación de hexámero es dirigida por las secuencias, SEC. ID. nº 85 (A) y nº 86 (B), nº 87 (A) y nº 88 (B), nº 89 (A) y nº 90 (B), y nº 91 (A) y nº 92 (B) (véanse las Figuras 13 y 14).

Debido a la afinidad sumamente alta para el VIH-LTR que puede generarse utilizando un TBA multimérico, los compuestos que tienen esta estructura y que pueden utilizarse con este fin en la presente memoria se denominan “VIH-Lock”.

Un VIH-Lock óptimo se define por el seguimiento de las huellas (según los métodos bien conocidos en la técnica) de los TBA unidos a las TBR en la LTR del VIH para confirmar que la afinidad de unión de cada proteína que se une al ADN que contribuye a la formación del complejo TBA multimérico se desplaza hacia abajo con respecto a la afinidad para cualquiera secuencia diana natural (es decir los CNA) a partir de la cual deriva la unidad de reconocimiento que se une al ADN del TBA. Cualquier pérdida correspondiente en la afinidad de unión para las TBR del VIH está más que compensada por la formación del multímero como se describe a continuación.

Puede existir competencia entre la unión de cada componente TBA para su TBR y montaje, por las secuencias con asimetría para formar el multímero. Esto se obvia ajustando los enlazadores entre la chaperona y las secuencias de asimetría en cada componente TBA de modo que estos episodios de competencia se desacoplen. La reducción resultante en la dimensionalidad de difusión (aumento de concentración eficaz) para la asimetría del TBA y los componentes del montaje da como resultado la formación eficaz del complejo multimérico.

Basándose en el seguimiento de huellas, se ajusta la longitud y composición de los enlazadores para conseguir la discriminación óptima entre las secuencias del VIH diana y las secuencias naturales. De este modo, aunque cada componente TBA tendrá una afinidad baja para las secuencias de CNA y TBR, el complejo multimérico tendrá una afinidad sumamente alta para el TBR expandido ahora reconocido por el complejo multimérico (el

cuadrado de la afinidad de cada TBR reconocida por cada componente TBA del TBA multimérico), aunque todavía tiene una baja afinidad para los CNA. Del mismo modo, se preparan otros complejos de TBA multimérico, aparte del VIH-Lock.

- 5 Los TBA que pueden formarse de este modo incluyen las secuencias siguientes, que se montan uniendo las subunidades de proteína o las secuencias de ácido nucleico que codifican estas subunidades, de la forma siguiente:

<u>Serie</u>	<u>Secuencias de enlace de los grupos</u>
A	I + II + III
B	IV + V + III
C	IV + III

- 10 en la que los grupos I a V están constituidos por las secuencias seleccionadas de entre:

<u>Grupo</u>	<u>Seleccionado de entre las secuencias</u>
I	Cualquiera de las SEC. ID. nº 85 a nº 92
II	Met Ser unido a cualquiera de las SEC. ID. nº 104 a nº 106, cada una de las cuales está unida a la SEC. ID. nº 99.
III	SEC. ID. nº 100 unida a cualquiera de las SEC. ID. nº 75 a nº 84 o nº 94 a nº 98; SEC. ID. nº 101 unida a SEC. ID. nº 74 o SEC. ID. nº 93; o SEC. ID. nº 102 unida a SEC. ID. nº 74 o SEC. ID. nº 93; o cualquiera de las SEC. ID. nº 72, nº 103, nº 73 o nº 63 a nº 71.
IV	Cualquiera de las SEC. ID. nº 104 a nº 106.
V	SEC. ID. nº 99.

- 15 Ejemplos específicos de dichos TBA son las SEC. ID. nº 109 a nº 116, ensambladas de la forma siguiente:

<u>Serie</u>	<u>SEC. ID. nº</u>	<u>SEC. ID. de unión</u>
A	109	85 + Met Ser + 104 + 99 + 100 + 94
A	110	85 + Met Ser + 104 + 99 + 72
A	111	86 + Met Ser + 105 + 99 + 102 + 74
A	112	86 + Met Ser + 106 + 99 + 73
A	113	89 + Met Ser + 106 + 99 + 63
C	114	106 + 64
C	115	105 + 64
B	116	106 + 99 + 73

- 20 De este modo, seleccionando entre secuencias con asimetría apropiada, secuencias de montaje, y unidades de reconocimiento del ADN, pueden formarse muchos TBA diferentes. Además, series de estos, tales como las SEC. ID. nº 114 y nº 115, se asociarán entre sí pero no se formarán dímeros de la SEC. ID. nº 114 o nº 115 debido a la repulsión de cargas en las secuencias de montaje mutadas (SEC. ID. nº 104 es *cro*; la SEC. ID. nº 105 es una nueva *cro* mutada y con carga negativa y la SEC. ID. nº 106 es una nueva *cro* mutada y

con carga positiva).

5 Naturalmente, dada la secuencia de aminoácidos de estos TBA, cualquier experto puede producir clones de ácido nucleico recombinante que codifica a éstos, y dichos clones recombinantes forman naturalmente una parte integrante de la presente invención.

#### **EJEMPLO 10 – Prueba de VIH utilizando “VIH-LOCK”**

10 En mucha parte del mismo método utilizado en el Ejemplo 6, el “HIV-LOCK” producido según el Ejemplo 9 se utiliza como TBA, reactivo 2, con resultados similares.

#### **EJEMPLO 11 – Prueba del VIH utilizando “VIH-LOCK” en análisis de sangre para donación**

15 Cuando la cantidad de sangre que va a analizarse no es limitativa, como cuando las muestras de sangre para donación son para analizar la contaminación por VIH, se realizan análisis similares a los del Ejemplo 6, pero para cada uno de los tubos a A-C, se sedimentan 20 5 ml de sangre en una centrifugadora de sobremesa. Otros reactivos se aumentan a escala según sea necesario para manipular la mayor cantidad de TNA presente en la muestra.

#### **EJEMPLO 12 – “VIH-LOCK” como agente terapéutico anti-VIH**

25 El “VIH-LOCK” producido según el Ejemplo 9 se formula en forma de solución de 1 mg/ml en liposomas y se inyecta por vía intravenosa a un paciente al que se ha analizado y confirmado para ser infectado con VIH. Una dosis de aproximadamente 0,1 mg a 100 mg 30 de “VIH-LOCK/kilogramo de masa corporal se infunde durante un periodo de veinticuatro horas y se controla la concentración de p24 del VIH en el suero del paciente. El tratamiento se repite tan a menudo como sea necesario, tal como cuando se producen elevaciones en el p24 del suero.

#### **EJEMPLO 13 – Utilización de un montaje VIH-TBA como terapéutico**

35 Un vector retroviral recombinante o similar se utiliza para administrar un montaje que codifica un TBA que se une a VIH-LTR a un paciente infectado. El vector codifica una 40 chaperona, tal como *cro*, y secuencias de ADN para unir porciones de p50. El mismo vector codifica asimismo una chaperona en la que se pliega un SP1-TBA. Se proporcionan secuencias con asimetría de modo que en la coexpresión del p50-TBA y del SP1-TBA en una célula infectada con VIH aislado *in vivo*, se produce una asociación inmediata entre 45 estos TBA, mientras que al mismo tiempo se evita cualquier asociación entre la porción de p50 que se une al ADN y monómeros p50 o p65 endógenos. Se proporcionan también secuencias de NLS en las TBA de modo que, en la formación del dímero, el TBA se resitúa inmediatamente en el núcleo de la célula y se une específicamente a las secuencias integradas del VIH, impidiendo de este modo cualquier transcripción desde este locus.

Con este objeto, es deseable seleccionar secuencias que codifiquen dominios de

unión al ADN de modo que los monómeros expresados se ensamblen en un TBA que no se une a las secuencias humanas naturales. Así, es únicamente en la unión de los componentes del TBA a sus secuencias dianas que se produce la asociación entre todos los componentes del TBA para formar un complejo que se une íntima y específicamente a la LTR del VIH.

#### **EJEMPLO 14 – Kit de ensayo de diagnóstico para papilomavirus humano**

Este diagnóstico para el papilomavirus humano aprovecha el diferencial conocido entre el PVH benigno y carcinógeno para proporcionar una prueba que indique la susceptibilidad al cáncer en un paciente. Los papilomavirus son un grupo de virus con ADN pequeño asociados a tumores benignos de células epiteliales escamosas en los vertebrados superiores. Se han encontrado por lo menos 27 tipos distintos de papilomavirus humano (PVH). Muchos de éstos se han asociado a lesiones clínicas específicas. Cuatro de éstos, PVH-6, PVH-11, PVH-16, PVH-18 y PVH-33 se han asociado a lesiones del aparato genital humano. En general, los ADN del PVH-6 y del PVH-11 se han encontrado asociados a lesiones benignas del aparato genital. Los PVH-16, PVH-18 y PVH-33 se han encontrado también asociados a lesiones premalignas y malignas y se transcriben en la mayoría de las líneas celulares demostradas en carcinomas cervicales. Los PVH-16, PVH-18 y PVH-33 son probablemente los únicos dos miembros de una gran serie de ADN de PVH asociados a carcinomas cervicales humanos malignos.

En modelos animales se ha demostrado que las lesiones por papilomavirus benigno pueden evolucionar a lesiones malignas en presencia de un cocarcinógeno. Se ha detectado ADN de PVH en la metástasis de carcinomas cervicales. En las lesiones cervicales malignas, el ADN del PVH se integra normalmente en el genoma humano, pero pueden también estar presentes en el ADN del PVH extracromosómico. La integración del PVH para formar el provirus produce normalmente la destrucción del marco de lectura abierto (ORF) del E2 vírico. A pesar de la destrucción del ORF del E2, y del examen de las líneas celulares de varios carcinomas cervicales PVH-16 y PVH-18 se han mostrado transcripcionalmente activos e integrados. Cuando se han examinado los genomas del PVH-16 que están presentes en las líneas celulares SiHa y CaSki del carcinoma cervical humano, se detectan diferencias en la integración del PVH-16. En la línea SiHa, la integración del genoma EVH-16 aislado tuvo lugar en las bases 3132 y 3384, destruyendo los ORF de E1 y E2 con una delección de 0,3 kb. Una delección adicional del ADN del PVH-16 de 50 pares de bases se produjo en los ORF de E2 y E4 que están fusionados. El fragmento 5' del ADN del PVH-16, constituido por el ORF de E2 destruido, se liga a las secuencias que flanquean el lado derecho humano continuo. Además, se detecta una guanina adicional aislada en el nucleótido 1138 en medio del ORF de E1. Esta adición del par de bases se produce en la fusión de los ORF de E1a y E1b a un ORF de E1 aislado.

El genoma completo del PVH-16 está disponible en GenBank con el número de registro K02718; el genoma completo del PVH-33 está disponible en GenBank con el número de registro M12732; el genoma completo del PVH-18 está disponible en GenBank con el número de registro X05015.

Como filtro preliminar, el hecho de que se demuestre una infección por PVH en una muestra de biopsia cervical dada mediante un simple tipo "sí/no" de análisis utilizando, por

ejemplo, alguna o todas las SEC. ID. nº 46 a nº 53 de los PNA y un TBA de E2 tal como se describe anteriormente (es decir, el fragmento de ADN, que se une al PNA, se inmoviliza con el TBA, y detecta la señal con los BNA y BBA).

5 Una vez se observa que la muestra de biopsia es positiva al PVH, se obtiene información adicional en cuanto al potencial maligno del PVH analizando el estado de integración del virus en el genoma humano.

- 10 1. Se fragmenta el ADN en la muestra de biopsia cervical y se hibrida a una sonda de bloqueo que tiene la secuencia, SEC. ID. nº 60. Esta sonda se unirá a todos los fragmentos en el ADN que no hayan sido cortados y empalmados fuera del fragmento de 0,3 kb.
- 15 2. Se expone el ADN en la muestra de biopsia a un PNA que presenta la secuencia, SEC. ID. nº 61. Esta sonda se unirá solamente a fragmentos que hayan eliminado el fragmento de 0,3 kb (la sonda de bloqueo impedirá el enrollamiento de los segmentos de delección grande si están presentes).
- 20 3. Se hibrida un PNA que presenta la SEC. ID. nº 62 con la SEC. ID. nº 41 para formar una BBR que se unirá a *cro* o al represor  $\lambda$  CI como BBA, dejando una parte monocatenaria que puede hibridarse con la secuencia TATA en la SEC. ID. nº 61. Esto se añade para formar una TBR en el extremo 5' de la delección grande.
- 25 4. La TBR se inmoviliza mediante un TBA que tiene una unidad de reconocimiento de ADN de la proteína que se une a TATA.
5. Los fragmentos unidos se detectan añadiendo los BNA y BBA tal como se describió anteriormente.

30 La detección de la señal en este ensayo indica que el fragmento grande se detecta en el PVH presente en el TNA. Dado que esta delección se correlaciona con el cáncer, este ensayo proporciona comprensión en el potencial de tumor maligno de la infección por PVH. Esta conclusión puede confirmarse realizando un análisis análogo basado en la delección de un fragmento de 52 pares de bases que está también correlacionado con el tumor maligno producido por PVH.

35 La unidad de reconocimiento de TBP utilizada en el TBA para este ensayo puede seleccionarse, por ejemplo, entre una secuencia tal como SEC. ID. nº 70 o SEC. ID. nº 93.

40

### **EJEMPLO 15 – Producción de VIH-LOCK™ recombinante**

45 **Fase uno – Preparación de ADN para producir el VIH-Lock™.** La mutagénesis *in vitro* de las zonas de codificación de los compuestos clonados naturales del VIH-Lock™ que necesitan modificarse se realiza con un kit Phagemid de MutaGene. El protocolo modificado incluye la utilización de un plásmido Blue-script que contiene cada uno de los componentes de unión de VIH-Lock™. Éstos se transforman en células competentes y se desarrollan fagómidos que contienen uracilo. Se extrae el ADN monocatenario y se utiliza como plantilla para la cadena mutágena. Se sintetizan oligonucleótidos que contienen las mutaciones

deseadas, incluyendo la incorporación de una nueva secuencia de restricción, y se tratan con polinucleótido cinasa y ATP. Los oligonucleótidos tratados con cinasa se hibridan a la plantilla monocatenaria, y se sintetiza una cadena mutágena y se liga según el protocolo de MutaGene, con excepción de que la Sequenase 2.0 aporta la polimerasa. Se criban bancos utilizando tanto nucleótidos marcados en el extremo con g-<sup>32</sup>P que contienen secuencias complementarias para las mutaciones introducidas como aislando el ADN plásmido e identificando las mutaciones por la presencia de la secuencia de restricción introducida. Las mutaciones se confirman asimismo por secuenciado con un kit Sequenase. Se clona ADN de VIH-Lock<sup>TM</sup> en el sistema de expresión de baculovirus con un activador poliédrico.

**Fase dos – Producción de proteínas de VIH-Lock<sup>TM</sup> utilizando baculovirus.** Se cultivan células Sf-9 a una densidad predeterminada (aproximadamente 1×10<sup>6</sup> células/ml, fase log), infectadas con el baculovirus que contiene las instrucciones del VIH-Lock<sup>TM</sup> y se recoge para recuperar las proteínas recombinantes que comprenden el VIH-Lock<sup>TM</sup>. En el proceso a escala creciente, los cultivos se propagan en matraces con agitadores y posteriormente a biorreactores. Después de la infección se recogen las células a las 12, 24, 36 y 48 horas para la proteína. Se controlan los índices de viabilidad en todo el proceso.

**Fase tres – Purificación de las proteínas de VIH-Lock<sup>TM</sup>.** Las proteínas recogidas se separan en primer lugar de las partículas por ultracentrifugación en flujo a través para facilitar la purificación corriente abajo. El producto centrifugado se filtra estéril a continuación. Los extractos se centrifugan a continuación a 40.000 rpm a 4°C durante 30 minutos y se inmunoprecipitan las alícuotas con anticuerpo de conejo policlonal contra uno de los componentes de VIH-Lock<sup>TM</sup>. Las proteínas inmunoprecipitadas se introducen en un gel SDS-10% PAGE.

**Fase cuatro – Análisis de proteínas de VIH-Lock<sup>TM</sup> frente al ADN del VIH.** Se realizan ensayos de desplazamiento por movilidad utilizando una sonda de oligonucleótido que comprende los elementos de la repetición terminal larga del VIH y fragmentos que contienen ADN que se une a NFκB asociado a la cadena ligera kappa y regulación de microglobulina. El oligonucleótido se hibrida con su cadena complementaria y el extremo se marca con ATP con g-<sup>32</sup>P.

El seguimiento de las huellas se realiza por combinación pequeña (10<sup>-15</sup> M) de ADN de LTR del VIH radiomarcado con una cantidad ligeramente mayor de VIH-Lock<sup>TM</sup> en un tampón a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añade ditiotreitol antes de la adición de la proteína. Se añaden hierro (II), EDTA, peróxido de hidrógeno y ascorbato sódico y se incuba la mezcla de reacción. Se añade un agente de enfriamiento y se analizan los productos que demandan electroforesis en gel desnaturizante. Esto se realiza para diferentes concentraciones de proteína. El gel resultante se detecta por imagen utilizando un escáner phosphoimager y la fila de la imagen por alta resolución resultante se analiza para abstraer la afinidad de unión del VIH-Lock<sup>TM</sup> para el ADN del VIH con respecto al ADN celular.

Pueden utilizarse múltiples diseños e iteraciones de prueba para recomprobar la unión de VIH-Lock<sup>TM</sup> y otros TBA para VIH y otros organismos. Este procedimiento hace posible diseñar montajes de unión de modo que el montaje de unión no sea competitivo con las proteínas naturales para las secuencias de unión aisladas en las muestras de genoma. El desarrollo de los TBA para otros organismos y los TNA para las secuencias en estos

organismos puede realizarse utilizando el método mencionado anteriormente. Este método es válido cuando se produzcan montajes de unión para todas las TBR de ácido nucleico incluyendo los híbridos ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN y combinaciones de estos híbridos.

5

**EJEMPLO 16 – Método para la identificación de moléculas que se añaden a ácido nucleico destinadas a la producción de los TBA y los BBA de la invención:**

10 En el método de la presente invención, los montajes de unión a la diana y los montajes de unión al refuerzo se ensamblan identificando moléculas de unión al ácido nucleico y uniendo los fragmentos de las moléculas que se unen al ácido nucleico de tal modo que se consiga que los TBA que discriminan entre secuencias diana específicas e incluso secuencias estrechamente relacionadas. Un método para la identificación de las  
15 moléculas que se unen al ácido nucleico implica las etapas siguientes:

1. Obtener una muestra biológica que contiene el ácido nucleico diana. Ésta podría ser, por ejemplo, un organismo o un extracto tisular infectado con un patógeno.
- 20 2. Dividir la muestra a fin de exponer los ácidos nucleicos y reducir la complejidad de tamaño de los ácidos nucleicos contenidos en la muestra.
3. Poner en contacto la primera alícuota de los ácidos nucleicos divididos con un medio de tampón de referencia y poner en contacto la segunda alícuota de los ácidos nucleicos divididos con un medio de tampón de referencia que contiene un perfil conocido de moléculas que se unen al ácido nucleico.
- 25 4. Analizar las dos alícuotas para identificar los fragmentos que han alterado el comportamiento en la alícuota puesta en contacto con las moléculas que se unen a la diana en oposición a la alícuota de referencia. Esto se realiza por electroforesis en gel de una sola dimensión, electroforesis en gel en dos dimensiones, cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía en papel o cualquier otro método que ponga de manifiesto un comportamiento diferente de los fragmentos de ácido nucleico cuando se unen a una molécula que se une al ácido nucleico al contrario que cuando el fragmento de ácido nucleico no está unido.
- 30 5. Identificar y aislar los fragmentos que no presentan un comportamiento alterado cuando se ponen en contacto con la molécula que une el ácido nucleico y secuenciar el fragmento de ácido nucleico para determinar si están presentes motivos de la molécula que se une al ácido nucleico conocida, o identificar directamente la molécula que se une al ácido nucleico unida al ácido nucleico. Esta última puede conseguirse, por ejemplo, poniendo en contacto una rejilla de dos dimensiones de los ácidos nucleicos electroforizados con anticuerpos marcados diferencialmente que se unen a varias moléculas de unión del ácido nucleico.
- 35 40 45

En este método, se utilizan preferentemente motivos de ácido nucleico con fines de diagnóstico o terapéutico en los que el ácido nucleico diana presenta más de una molécula diana que se une al ácido nucleico utilizable una vez. De esta manera, puede generarse el montaje complejo de unión a la diana el cual aprovecha la proximidad de diferentes motivos

moleculares que se unen al ácido nucleico para aumentar la especificidad del TBA montado a partir de componentes identificados que se unen al ácido nucleico individual. Varias porciones que se unen al ácido nucleico de las moléculas que se unen al ácido nucleico se montan a continuación en los TBA completos, tal como se describió anteriormente, por ejemplo, para VIH-LOCK™.

### **EJEMPLO 17 – Método de identificación de secuencias de ARN específicas en una muestra**

Según los métodos y composiciones dados a conocer en la presente invención, cualquiera secuencia de ácido nucleico puede identificarse específicamente. La identificación del ARN del VIH diana en una muestra se consigue extrayendo una muestra de la sangre de un paciente u otro fluido o extracto biológico que pueda contener el ARN del VIH, y analizando la presencia de secuencias de unión al TAR. Tat es un regulador positivo de la replicación del VIH que se une a la zona TAR del ARN del VIH. La forma de VIH-Tat natural, completamente activa tiene 72 aminoácidos de longitud, SEC. ID. 118 en la presente memoria. Tat contiene por lo menos dos dominios funcionales, y transactiva la expresión génica de la repetición terminal larga del VIH (LTR del VIH). Tat se une a una estructura en bucle troncal de ARN formada a partir de la autohibridación de las secuencias en TAR, que es precisamente 5' para la LTR del VIH. El ARN de la TAR del VIH forma una protuberancia de dinucleótido y dos estructuras en bucle troncales (Rhim *et al.* 1994 *Virology*:202, 202-211). El Tat (SEC. ID. 118) se une a esta estructura con afinidad menor que lo hace a las variantes de Tat en las que Ala58 es una treonina o en las que His65 es un resto de Asp. (Derse *et al.*, 1993 *Virology*:194, 530-536). Utilizando estos factores en el presente método, éste se realiza de la forma siguiente:

1. Se fragmenta una muestra biológica para exponer los ácidos nucleicos y reducir la complejidad de tamaño de los ácidos nucleicos.
2. Se pone en contacto un TBA con la muestra que identifica una secuencia proteica que se une al TAR híbrido y una secuencia de flanqueamiento próxima en el genoma del VIH. El TBA utilizado con este objeto se ensambla en *cro* como chaperona utilizando Tat como molécula de unión específica para el ARN del VIH. Para proporcionar especificidad de modo que la diafonía entre la secuencia de TAR del VIH y las secuencias de TAR íntimamente relacionadas puedan estar presentes debido a dichos otros patógenos como citomegalovirus, el TBA también tiene un componente de anticuerpo que reconoce la zona de unión a la diana del híbrido ADN-ARN formada cuando un ácido nucleico sonda se une al ARN de la LTR del VIH.
3. Se elimina cualquier "diafonía" producida por la unión de Tat a la zona TAR del ARN del VIH debida a dichos contaminantes (RNA primos) como la secuencia TAR del CMV poniendo en contacto la reacción con variante Tat en exceso (una de las dos variantes Ala58 a Thr o His65 a Asp) que se une más ávidamente. De esta manera, los escenarios de unión individuales debido a la unión de TBA a unos ARN primos compiten en la muestra de ácido nucleico por la variante Tat. Por otra parte, seleccionando apropiadamente la afinidad de la unión doble conseguida como resultado del anticuerpo y Tat, el TBA no se desplaza de las dianas auténticas. Este

procedimiento se ilustra en la Figura 16. En otro aspecto de este mismo método, el TBA podía ser uno en el que, en lugar de utilizar una variante de Tat, se utilice un anticuerpo que reconoce a este segmento de ácido nucleico y el TBA utilizado es un anticuerpo TBA doble.

5

En una versión alternativa de este método, puede utilizarse un ácido nucleico sonda el cual se hibrida con el ARN de la LTR del VIH. Por consiguiente, un segmento doble de las secuencias sp1 de LTR puede crearse como parte de la zona de unión a la diana. Esta zona del ARN del VIH flanquea la zona TAR que es 5' de la LTR pero está en proximidad íntima a ésta. Un TBA que contiene Tat y dos unidades de unión a Sp1 se chaperona para proporcionar unión de Tat a TAR y unión de Sp1 a los lugares de unión Sp1. La ampliación y detección se realiza a continuación añadiendo los BNA, BBA y HNA apropiados. En otra alternativa incluso, no pudieron utilizarse los PNA que presentan la SEC. ID. 38 y la SEC. ID. 39 (véase la figura 7). Se añade un TBA que contiene una o más unidades de unión a Sp1 y una unidad de anticuerpo que se une al híbrido ADN-ARN producido a partir del ARN de la muestra y el PNA de la SEC. ID. nº 38. Se añaden a continuación los BNA, BBA y HNA apropiados para ampliar la señal.

10

15

20

Naturalmente, los expertos en la materia reconocerán que pueden utilizarse otras combinaciones de TBA y TNA para optimizar los métodos ejemplificados en la presente memoria.

25

Debe apreciarse que las secuencias son proporcionadas en la presente memoria únicamente a título de ejemplo y que otras secuencias similares sugeridas por éstas podrían utilizarse en los métodos de la presente invención. Debe apreciarse asimismo que aunque cualquier secuencia podría denominarse lineal, se pudo utilizar en una forma circular o permutada de otro modo y aunque se diseña como no complementaria, se pudo utilizar en la forma de codificación o sin codificación o para unir a secuencias complementarias de codificación o sin codificación.

30

### **LISTADO DE SECUENCIAS**

35

#### (1) INFORMACIÓN GENERAL:

##### (i) SOLICITANTE:

40

Nombre(s) del solicitante:	THE GENE POOL, INC.
Calle:	300 Queen Anne Ave. N., Suite 392
Ciudad:	Seattle
Estado/Provincia:	Washington
País:	EEUU
Código postal/Zip:	98109-4599
Número de teléfono:	(206) 526-8617
Número de Fax:	

45

##### (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: MÉTODO DE DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS CON UNA COMPOSICIÓN DE SECUENCIA ESPECÍFICA

##### (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 118

(iv) DIRECCIÓN DE LA CORRESPONDENCIA:	(A) DESTINATARIO: Saliwanchik & Saliwanchik (B) CALLE: 2421 N.W. 41st St., Suite A-1 (C) CIUDAD: Gainesville (D) ESTADO: Florida (E) PAÍS: USA (F) ZIP: 32606	5
(v): LISTADO DESCIFRABLE POR ORDENADOR:	(A) TIPO DE MEDIO: Disquete (B) ORDENADOR: IBM PC compatible (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS (D) PROGRAMA INFORMÁTICO: Patentin Release nº 1.0, Versión nº 1.25	10
(vi): DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD:	(A) NÚMERO DE LA SOLICITUD: (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: (C) CLASIFICACIÓN:	15
(viii): INFORMACIÓN DEL APODERADO/AGENTE:	(A) NOMBRE: Bencen, Gerard H. (B) NÚMERO DE REGISTRO: 35.746 (C) NÚMERO DE REFERENCIA /ETIQUETA: GP-100.C1	20
(ix): INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:	(A) TELÉFONO: (904) 375-8100 (B) TELÉFAX (904): 372-5800	25
(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 1:	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	30
(A) LONGITUD: 13 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas (D) CONFIGURACIÓN: lineal	35	
(ii) TIPO DE MOLECULA: ADNc (iii) HIPOTÉTICA: NO (iv) ANTISENTIDO: NO (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 1:	40	
(x) INFORMACIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 1:	45	

TGGGATTC CCA

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 2:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 13 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 2:

15

AAGGGACTTT CCC

13

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 3:

20

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 13 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

25

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 3:

30

AGGGGACTTT CCG

13

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 4:

35

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 15 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

40

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 4:

45

GCTGGGGACT TTCCA

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 15 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 5:

15 ACAAGGGACT TTCCG 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 13 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 6:

30 CCGGGTTTTTC CCC 13

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 27 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 7:

45 AAGGGACTTT CCGCTGGGGA CTTTCCA 27

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 27 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 8:

15

AAGGGACTTT CCGCTGGGGA CTTTCCG

27

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

- (A) LONGITUD: 26 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

25

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 9:

30

GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCGTGG

26

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

35

- (A) LONGITUD: 26 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

40

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 10:

45

GCTGGGGACT TTCCAGGGGA GGTGTG

26

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 26 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

5

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 11:

10

GCTGGGGACT TTCCGGGGAG CGTGGC

26

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 26 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

20

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 12:

25

GCTGGGGACT TTCCGGGGAG GCGCGG

26

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 26 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

35

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 13:

40

GCTGGGGACT TTCCAGAGAG GCGTGG

26

45

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 26 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 14:

GCTGGGGACT TTCCAGGGGA GCGGTG 26

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 26 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 15:

GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCGTGG 26

30 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 26 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 16:

GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCTGCC 26

45 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 33 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

5

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 17:

10

TTTCCAGGGA GCGGTGGCCT GGGCGGGACT GGG

33

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 18:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 33 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

20

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 18:

25

CGTGGCCTGG GCGGGACTGG GGAGTGGCGT CCC

33

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 19:

30

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 45 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

35

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 19:

40

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCT

45

45

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 20

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 46 pares de bases

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

- 5
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
  - (iii) HIPOTÉTICA: NO
  - (iv) ANTISENTIDO: NO
  - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 20:

10 CAGCAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT 46

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15
- (A) LONGITUD: 46 pares de bases
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
  - (D) CONFIGURACIÓN: lineal

- 20
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
  - (iii) HIPOTÉTICA: NO
  - (iv) ANTISENTIDO: NO
  - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 21:

25 CATCAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT 46

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30
- (A) LONGITUD: 46 pares de bases
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
  - (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 35

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 22:

40 CAACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT 46

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 45
- (A) LONGITUD: 45 pares de bases
  - (B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

- 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 23:

10 CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCAT 45

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 44 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

- 20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 24:

25 CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC GGGGAGGCGTG GCCT 44

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 44 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

- 35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 25:

40 CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC GGGGAGGCGC GGCT 44

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 26

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas

45	<p>(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:</p> <p>(A) LONGITUD: 43 pares de bases  (B) TIPO: ácido nucleico  (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  (D) CONFIGURACIÓN: lineal</p>
40	<p>(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 29:</p> <p>CTACAAGGGA CTTCCGCTG GGGACTTCC AGGAGGCGT GGGAG</p> <p>(ii) TIPO DE MOLECULA: ADNc  (iii) HIPOTÉTICA: NO  (iv) ANTISENTIDO: NO  (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 28:</p>
35	<p>(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:</p> <p>(A) LONGITUD: 46 pares de bases  (B) TIPO: ácido nucleico  (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  (D) CONFIGURACIÓN: lineal</p>
30	<p>(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 28</p> <p>CTACAAGGGA CTTCCGCTG GGGACTTCC AGGAGGCGG TGGACT</p> <p>(ii) TIPO DE MOLECULA: ADNc  (iii) HIPOTÉTICA: NO  (iv) ANTISENTIDO: NO  (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 27:</p>
25	<p>(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:</p> <p>(A) LONGITUD: 46 pares de bases  (B) TIPO: ácido nucleico  (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  (D) CONFIGURACIÓN: lineal</p>
20	<p>(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 27:</p> <p>CTACAAGGGA CTTCCGCTG GGGACTTCC AGAGAGGCGT GGACT</p> <p>(ii) TIPO DE MOLECULA: ADNc  (iii) HIPOTÉTICA: NO  (iv) ANTISENTIDO: NO  (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 26:</p>
15	<p>(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:</p> <p>(A) LONGITUD: 46 pares de bases  (B) TIPO: ácido nucleico  (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  (D) CONFIGURACIÓN: lineal</p>
10	<p>(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 26:</p> <p>CTACAAGGGA CTTCCGCTG GGGACTTCC AGAGAGGCGT GGACT</p> <p>(ii) TIPO DE MOLECULA: ADNc  (iii) HIPOTÉTICA: NO  (iv) ANTISENTIDO: NO  (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 26:</p>
5	<p>(D) CONFIGURACIÓN: lineal</p>

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 29:

5

CTACAGGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCTG CCT

43

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 30:

10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 48 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

15

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 30:

20

CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGA CTGGG 48

25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 45 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

30

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 31:

35

TTTCCAGGGA GCGGTGGCCT GGGCGGGACT GGGGAGTGGC GTCCC

40

45

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 59 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

45

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 32:

5 CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG  
GGACTGGGG 59

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 33:

- 10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 59 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 33:

20 TTTCCGCTGG GGACTTTCCA GGGAGGCGTG GCCTGGGCGG GACTGGGGAG  
25 TGCGTCCC 59

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 34:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 70 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 34:

**CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGGGA 60**

**GTGGCGTCCC 70**

40 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 35

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 61ares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 35
- 5 **TATCACCGCC AGTGGTATTT ATGTCAACAC CGCCAGAGAT AATTTATCAC CGCAGATGGT** 60
- T** 61
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 36:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 10 (A) LONGITUD: 64 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 36:
- TATCACCGCA AGGGATAAAT ATCTAACACC GTGCGTGTTG ACTATTTTAC CTCTGGCGGT** 60
- GATA** 64
- 20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 37:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 25 (A) LONGITUD: 70 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 37:
- CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGGGA** 60
- GTGGCGTCCC** 70
- 35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 38:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 40 (A) LONGITUD: 37 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

5	(ii) TIPO DE MOLECULA: ADNc (iii) HIPOTÉTICA: NO (iv) ANTISENTIDO: NO (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 38:	CTACAAGGA CTTCCGCTG GGGACTTCC AGGAGG	37
10	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 39		
15	(A) LONGITUD: 22 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas (D) CONFIGURACIÓN: lineal (ii) TIPO DE MOLECULA: ADNc (iii) HIPOTÉTICA: NO (iv) ANTISENTIDO: NO (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 39:	CGGACTGGG GAGTGGCTC CC	22
25	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 40:		
30	(A) LONGITUD: 103 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas (D) CONFIGURACIÓN: lineal (ii) TIPO DE MOLECULA: ADNc (iii) HIPOTÉTICA: NO (iv) ANTISENTIDO: NO (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 40:	CTACAGGGA CTTCCGCTG GGGACTTTC AGGAGGTAT CACGCCAGT GGATTTATG	60
35	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 41:		
40	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	TCACACCCG CAGATTAAT TTATCACCCG AGATGGTCT GCA	103
45	(A) LONGITUD: 62 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas (D) CONFIGURACIÓN: lineal (ii) MA		

60	GAACATCTG CCGTGATAA TTAATCTGG CCGTGTGAC ATAAATACCA CTGGCGTGA	7A	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 42:	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	(A) LONGITUD: 71 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas (D) CONFIGURACIÓN: lineal	(ii) TIPO DE MOLECULA: ADNc (iii) HIPOTÉTICA: NO (iv) ANTISENTIDO: NO (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 42:	15
60	GATCAACCA TCTGGGGTGA TAAATATCT CTGGCGGTGT TGACATAAAT ACCACTGGCG	71	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 43:	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	(A) LONGITUD: 63 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas (D) CONFIGURACIÓN: lineal	(ii) TIPO DE MOLECULA: ADNc (iii) HIPOTÉTICA: NO (iv) ANTISENTIDO: NO (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 43:	25
63	GTG	63	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 44:	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	(A) LONGITUD: 21 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas (D) CONFIGURACIÓN: lineal	(ii) TIPO DE MOLECULA: ADNc (iii) HIPOTÉTICA: NO	40

- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 44:

GATCCGGGGG GATACCCCC G

21

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 45:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 91 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 45:

15

**CGGGACTGGG GAGTGGCGTC CCTATCACCG CAAGGGATAA ATATCTAACA CCGTGCCTGT**

60

**TGACTATTTT ACCTCTGGCG GTGATAGCAT G**

91

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 46:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 53 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

25

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 46:

30

CTAAGGGCGT AACCGAAATC GGTTGAACCG AAACCGGTTA GTATAAAAGC  
AGA

35

53

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 47:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40

- (A) LONGITUD: 54 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

45

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 47:

AAAAGGGAGT AACCGAAAAC GGTCGGGACC GAAAACGGTG TATATAAAG  
ATGT 54

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 48:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 54 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

- 15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 48:

20 AGTAGGGTGT AACCGAAAGC GGTTC AACCG AAAACGGTGC ATATATAAAG  
CAAA 54

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 49:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 24 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

- 35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 49:

GCTTCAACCG AATTCGGTTG CATG 24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 50:

40

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 24 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc  
(iii) HIPOTÉTICA: NO

- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 50:

TGTGCAACCG ATTTCCGGTTG CCTT

24

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 51:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 51:

15

TATGCAACCG AAATAGGTTG GGCA

24

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 52

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

30

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 52:

35

TGCCTAACCG TTTTCGGTTA CTTG

24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 53:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

45

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 53:

GGACTAACCG TTTTAGGTCA TATT

24

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 54:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10 (A) LONGITUD: 52 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 54:

GACGACTATC CAGCGACCAA GATCAGAGCC AGACACCGGA AACCCCTGCC  
AC 52

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 55:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 53 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 55:

40 GACGACACGG TATCCGCTAC TCAGCTTGTT AACAGCTAC AGCACACCCC  
CTC 53

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 56:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

45 (A) LONGITUD: 60 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

45	(A) LONGITUD: 80 Pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas (D) CONFIGURACIÓN: lineal
40	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 59:
77	ccctggcgcac ccgaaag
60	taatgaaatt gattgaaatg actcgaatg cagtaacagt accgtaattcc agcaccctgt
35	(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (iii) HIPOTÉTICA: NO (iv) ANTISENTIDO: NO (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 58:
30	(A) LONGITUD: 77 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas (D) CONFIGURACIÓN: lineal
25	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 58:
68	actcagt
60	catcccaag ccctggcctt gggcaccga gaaacacaa cactaaattg tgcacagag
20	(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (iii) HIPOTÉTICA: NO (iv) ANTISENTIDO: NO (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 57:
15	(A) LONGITUD: 68 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas (D) CONFIGURACIÓN: lineal
10	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 57
60	ttctgtcag
5	(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (iii) HIPOTÉTICA: NO (iv) ANTISENTIDO: NO (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 56:
60	gacgacgc ttgcagacac accagacccct tacaaagctg

- (v) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (vi) HIPOTÉTICA: NO
- (vii) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 59:

5

**ACAGACAACG ATAACCGACC ACCACAAGCA GCGGCCAAC ACCCCGCCTT GGACAATAGA 60**

**ACAGCACGTA CTGCAACTAA 80**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 60:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

- (A) LONGITUD: 266 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

15

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 60:

20

**CATATGCAAT ACAATGCATT ATACAACTG GACACATATA TATATTTGTG AAGAAGCATC 60**

**AGTAACTGTG GTAGAGGGTC AAGTTGACTA TTATGGTTTA TATTATGTTT ATGAAGGAAT 120**

**ACGAACATAT TTTGTGCAGT TTAAGATGA TGCAGAAAA TATAGTAAA ATAAAGTATG 180**

**GGAAGTTCAT GCGGGTGGTC AGGTAATATT ATGTCCTACA TCTGTGTTTA GCAGCAACGA 240**

**AGTATCCTCT CCTGAAATTA TTAGGC 266**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 61:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25

- (A) LONGITUD: 95 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

30

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 61:

35

**AGGATGTATA AAAAAACATG GATATACAGT GGAAGTGCAG TTTGATGGAG ACATATGCTA 60**

**TTAGGCAGCA CTGGCCAAC CACCCCGCCG CGACC 95**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 62:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 81 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) NÚMERO DE CADENAS: ambas  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 62:

**CATGTTTTTT TATACATCCA TATCACCGCC AGTGGTATTT ATGTCAACAC CGCCAGAGAT 60**

15 **AATTATCAC CGCAGATGGT T 81**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 63:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 322 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno  
30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 63:

Met	Ala	Asp	Asp	Asp	Pro	Tyr	Gly	Thr	Gly	Gln	Met	Phe	His	Leu	Asn	
1				5					10					15		
Thr	Ala	Leu	Thr	His	Ser	Ile	Phe	Asn	Ala	Glu	Leu	Tyr	Ser	Pro	Glu	
			20					25					30			
Ile	Pro	Leu	Ser	Thr	Asp	Gly	Pro	Tyr	Leu	Gln	Ile	Leu	Glu	Gln	Pro	
		35				40						45				
Lys	Gln	Arg	Gly	Phe	Arg	Phe	Arg	Tyr	Val	Cys	Glu	Gly	Pro	Ser	His	
	50					55					60					
Gly	Gly	Leu	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Glu	Lys	Asn	Lys	Lys	Ser	Tyr	Pro	
65					70					75					80	
Gln	Val	Lys	Ile	Cys	Asn	Tyr	Val	Gly	Pro	Ala	Lys	Val	Ile	Val	Gln	
				85				90						95		
Leu	Val	Thr	Asn	Gly	Lys	Asn	Ile	His	Leu	His	Ala	His	Ser	Leu	Val	
			100					105						110		

Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Val Cys Thr Val Thr Ala Gly Pro Lys  
115 120 125

Asp Met Val Val Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile Leu His Val Thr Lys  
130 135 140

Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met Thr Glu Ala Cys Ile  
145 150 155 160

Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Ser Asp Leu Ala Tyr Leu  
165 170 175

Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Thr Asp Arg Glu Lys Glu  
180 185 190

Ile Ile Arg Gln Ala Ala Val Gln Gln Thr Lys Glu Met Asp Leu Ser  
195 200 205

Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro Asp Ser Thr Gly Ser  
210 215 220

Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp Ala Ile Tyr Asp Ser  
225 230 235 240

Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val Arg Met Asp Arg Thr  
245 250 255

Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr Leu Leu Cys Asp Lys  
260 265 270

Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr Glu Glu Glu Glu Asn  
275 280 285

Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser Pro Thr Asp Val His  
290 295 300

Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys Asp Val Asn  
305 310 315 320

Ile Thr

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 64:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 325 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 64:

Met Ala Glu Asp Asp Pro Tyr Leu Gly Arg Pro Glu Gln Met Phe His  
1 5 10 15

Leu Asp Pro Ser Leu Thr His Thr Ile Phe Asn Pro Glu Val Phe Gln  
20 25 30

Pro Gln Met Ala Leu Pro Thr Ala Asp Gly Pro Tyr Leu Gln Ile Leu  
35 40 45

Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys Glu Gly  
50 55 60

Pro Ser His Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn Lys Lys  
65 70 75 80

Ser Tyr Pro Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala Lys Val  
85 90 95

Ile Val Gln Leu Val Thr Asn Gly Lys Asn Ile His Leu His Ala His  
100 105 110

Ser Leu Val Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Ile Cys Thr Val Thr Ala  
115 120 125

Gly Pro Glu Asp Cys Val His Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile Leu His  
130 135 140

Val Thr Lys Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met Thr Glu  
145 150 155 160

Ala Cys Ile Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Pro Asp Leu  
165 170 175

Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Gly Asp Arg  
180 185 190

Glu Lys Glu Leu Ile Arg Gln Ala Ala Leu Gln Gln Thr Lys Glu Met  
195 200 205

Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro Asp Ser  
210 215 220

Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp Ala Ile  
225 230 235 240

Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val Arg Met  
245 250 255

Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr Leu Leu  
260 265 270

Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr Glu Glu  
275 280 285

Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser Pro Thr  
290 295 300  
Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys  
305 310 315 320  
Asp Ile Asn Ile Thr  
325

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 65:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 268 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 65:

Met Glu Pro Ala Asp Leu Leu Pro Leu Tyr Leu Gln Pro Glu Trp Gly  
1 5 10 15  
Glu Gln Glu Pro Gly Gly Ala Thr Pro Phe Val Glu Ile Leu Glu Gln  
20 25 30  
Pro Lys Gln Arg Gly Met Arg Phe Arg Tyr Lys Cys Glu Gly Arg Ser  
35 40 45  
Ala Gly Ser Ile Pro Gly Glu His Ser Thr Asp Ser Ala Arg Thr His  
50 55 60  
Pro Thr Ile Arg Val Asn His Tyr Arg Gly Pro Gly Arg Val Arg Val  
65 70 75 80  
Ser Leu Val Thr Lys Asp Pro Pro His Gly Pro His Pro His Glu Leu  
85 90 95  
Val Gly Arg His Cys Gln His Gly Tyr Tyr Glu Ala Glu Leu Ser Pro  
100 105 110  
Asp Arg Ser Ile His Ser Phe Gln Asn Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys  
115 120 125  
Lys Arg Glu Leu Glu Ala Ala Val Ala Glu Arg Ile Arg Thr Asn Asn  
130 135 140  
Asn Pro Phe Asn Val Pro Met Glu Glu Arg Gly Ala Glu Tyr Asp Leu  
145 150 155 160

Ser Ala Val Arg Leu Cys Phe Gln Val Trp Val Asn Gly Pro Gly Gly  
165 170 175

Leu Cys Pro Leu Pro Pro Val Leu Ser Gln Pro Ile Tyr Asp Asn Arg  
180 185 190

Ala Pro Ser Thr Ala Glu Leu Arg Ile Leu Pro Gly Asp Arg Asn Ser  
195 200 205

Gly Ser Cys Gln Gly Gly Asp Glu Ile Phe Leu Leu Cys Asp Lys Val  
210 215 220

Gln Lys Glu Asp Ile Glu Val Arg Phe Trp Ala Glu Gly Trp Glu Ala  
225 230 235 240

Lys Gly Ser Phe Ala Ala Ala Asp Val His Arg Gln Val Ala Ile Val  
245 250 255

Phe Arg Thr Pro Pro Phe Arg Glu Arg Ser Leu Arg  
260 265

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 66:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 263 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 66:

Met Asp Asp Leu Phe Pro Leu Ile Phe Pro Ser Glu Pro Ala Gln Ala  
1 5 10 15

Ser Gly Pro Tyr Val Glu Ile Ile Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Met  
20 25 30

Arg Phe Arg Tyr Lys Cys Glu Gly Arg Ser Ala Gly Ser Ile Pro Gly  
35 40 45

Glu Arg Ser Thr Asp Thr Thr Lys Thr His Pro Thr Ile Lys Ile Asn  
50 55 60

Gly Tyr Thr Gly Pro Gly Thr Val Arg Ile Ser Leu Val Thr Lys Asp  
65 70 75 80

Phe Gln Asn Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Arg Asp Leu Glu Gln  
115 120 125

Ala Ile Ser Gln Arg Ile Gln Thr Asn Asn Asn Pro Phe His Val Pro  
130 135 140

Ile Glu Glu Gln Arg Gly Asp Tyr Asp Leu Asn Ala Val Arg Leu Cys  
145 150 155 160

Phe Gln Val Thr Val Arg Asp Pro Ala Gly Arg Pro Leu Leu Leu Thr  
165 170 175

Pro Val Leu Ser His Pro Ile Phe Asp Asn Arg Ala Pro Asn Thr Ala  
180 185 190

Glu Leu Lys Ile Cys Arg Val Asn Arg Asn Ser Gly Ser Cys Leu Gly  
195 200 205

Gly Asp Glu Ile Phe Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Glu Asp Ile  
210 215 220

Glu Val Tyr Phe Thr Gly Pro Gly Trp Glu Ala Arg Gly Ser Phe Ser  
225 230 235 240

Gln Ala Asp Val His Arg Gln Val Ala Ile Val Phe Arg Thr Pro Pro  
245 250 255

Tyr Ala Asp Pro Ser Leu Gln  
260

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 67:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 263 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 67:

Met Asp Glu Leu Phe Pro Leu Ile Phe Pro Ala Glu Pro Ala Gln Ala  
1 5 10 15

Ser Gly Pro Tyr Val Glu Ile Ile Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Met  
20 25 30

Arg Phe Arg Tyr Lys Cys Glu Gly Arg Ser Ala Gly Ser Ile Pro Gly  
35 40 45

Glu Arg Ser Thr Asp Thr Thr Lys Thr His Pro Thr Ile Lys Ile Asn  
50 55 60

Gly Tyr Thr Gly Pro Gly Thr Val Arg Ile Ser Leu Val Thr Lys Asp  
65 70 75 80

Pro Pro His Arg Pro His Pro His Glu Leu Val Gly Lys Asp Cys Arg  
85 90 95

Asp Gly Phe Tyr Glu Ala Glu Leu Cys Pro Asp Arg Cys Ile His Ser  
100 105 110

Phe Gln Asn Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Arg Asp Leu Glu Gln  
115 120 125

Ala Ile Ser Gln Arg Ile Gln Thr Asn Asn Asn Pro Phe Gln Val Pro  
130 135 140

Ile Glu Glu Gln Arg Gly Asp Tyr Asp Leu Asn Ala Val Arg Leu Cys  
145 150 155 160

Phe Gln Val Thr Val Arg Asp Pro Ser Gly Arg Pro Leu Arg Leu Pro  
165 170 175

Pro Val Leu Pro His Pro Ile Phe Asp Asn Arg Ala Pro Asn Thr Ala  
180 185 190

Glu Leu Lys Ile Cys Arg Val Asn Arg Asn Ser Gly Ser Cys Leu Gly  
195 200 205

Gly Asp Glu Ile Phe Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Glu Asp Ile  
210 215 220

Glu Val Tyr Phe Thr Gly Pro Gly Trp Glu Ala Arg Gly Ser Phe Ser  
225 230 235 240

Gln Ala Asp Val His Arg Gln Val Ala Ile Val Phe Arg Thr Pro Pro  
245 250 255

Tyr Ala Asp Pro Ser Leu Gln  
260

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 68:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 299 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
  - (iv) ANTISENTIDO: NO
  - (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- 15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 68:

Met Phe Pro Asn Gln Asn Asn Gly Ala Ala Pro Gly Gln Gly Pro Ala  
1 5 10 15

Val Asp Gly Gln Gln Ser Leu Asn Tyr Asn Gly Leu Pro Ala Gln Gln  
20 25 30

Gln Gln Gln Leu Ala Gln Ser Thr Lys Asn Val Arg Lys Lys Pro Tyr  
35 40 45

Val Lys Ile Thr Glu Gln Pro Ala Gly Lys Ala Leu Arg Phe Arg Tyr  
50 55 60

Glu Cys Glu Gly Arg Ser Ala Gly Ser Ile Pro Gly Val Asn Ser Thr  
65 70 75 80

Pro Glu Asn Lys Thr Tyr Pro Thr Ile Glu Ile Val Gly Tyr Lys Gly  
85 90 95

Arg Ala Val Val Val Val Ser Cys Val Thr Lys Asp Thr Pro Tyr Arg  
100 105 110

Pro His Pro His Asn Leu Val Gly Lys Glu Gly Cys Lys Lys Gly Val  
115 120 125

Cys Thr Leu Glu Ile Asn Ser Glu Thr Met Arg Ala Val Phe Ser Asn  
130 135 140

Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Lys Asp Ile Glu Ala Ala Leu Lys  
145 150 155 160

Ala Arg Glu Glu Ile Arg Val Asp Pro Phe Lys Thr Gly Phe Ser His  
165 170 175

Arg Phe Gln Pro Ser Ser Ile Asp Leu Asn Ser Val Arg Leu Cys Phe  
180 185 190

Gln Val Phe Met Glu Ser Glu Gln Lys Gly Arg Phe Thr Ser Pro Leu  
195 200 205

Pro Pro Val Val Ser Glu Pro Ile Phe Asp Lys Lys Ala Met Ser Asp  
210 215 220

Leu Val Ile Cys Arg Leu Cys Ser Cys Ser Ala Thr Val Phe Gly Asn  
225 230 235 240

Thr Gln Ile Ile Leu Leu Cys Glu Lys Val Ala Lys Glu Asp Ile Ser  
245 250 255

Val Arg Phe Phe Glu Glu Lys Asn Gly Gln Ser Val Trp Glu Ala Phe  
260 265 270

Gly Asp Phe Gln His Thr Asp Val His Lys Gln Thr Ala Ile Thr Phe  
275 280 285

Lys Thr Pro Arg Tyr His Thr Leu Asp Ile Thr  
290 295

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 69:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5 (A) LONGITUD: 261 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 69:

Met Asp Phe Leu Thr Asn Leu Arg Phe Thr Glu Gly Ile Ser Glu Pro  
1 5 10 15  
Tyr Ile Glu Ile Phe Glu Gln Pro Arg Gln Arg Gly Thr Arg Phe Arg  
20 25 30  
Tyr Lys Cys Glu Gly Arg Ser Ala Gly Ser Ile Pro Gly Glu His Ser  
35 40 45  
Thr Asp Asn Asn Lys Thr Phe Pro Ser Ile Gln Ile Leu Asn Tyr Phe  
50 55 60  
Gly Lys Val Lys Ile Arg Thr Thr Leu Val Thr Lys Asn Glu Pro Tyr  
65 70 75 80  
Lys Pro His Pro His Asp Leu Val Gly Lys Gly Cys Arg Asp Gly Tyr  
85 90 95  
Tyr Glu Ala Glu Phe Gly Pro Glu Arg Gln Val Leu Ser Phe Gln Asn  
100 105 110  
Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Lys Asp Leu Lys Glu Ser Ile Ser  
115 120 125  
Leu Arg Ile Ser Lys Lys Asn Pro Phe Asn Val Pro Glu Glu Gln Leu  
130 135 140  
His Asn Ile Asp Glu Tyr Asp Leu Asn Val Val Arg Leu Cys Phe Gln  
145 150 155 160  
Ala Phe Leu Pro Asp Glu His Gly Asn Tyr Thr Leu Ala Leu Pro Pro  
165 170 175  
Leu Ile Ser Asn Pro Ile Tyr Asp Asn Arg Ala Pro Asn Thr Ala Glu  
180 185 190  
Leu Arg Ile Cys Arg Val Asn Lys Asn Cys Gly Ser Val Lys Gly Gly  
195 200 205

15

Asp Glu Ile Phe Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Glu  
210 215 220

Val Arg Phe Val Leu Gly Asn Trp Glu Ala Lys Gly Ser Phe Ser Gln  
225 230 235 240

Ala Asp Val His Arg Gln Val Ala Ile Val Phe Arg Thr Pro Pro Phe  
245 250 255

Leu Gly Asp Ile Thr  
260

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 70:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 262 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 70:

15

Met Asp Phe Leu Thr Asn Leu Arg Phe Thr Glu Gly Ile Ser Glu Pro  
1 5 10 15

Tyr Ile Glu Ile Phe Glu Gln Pro Arg Gln Arg Gly Met Arg Phe Arg  
20 25 30

Tyr Lys Cys Glu Gly Arg Ser Ala Gly Ser Ile Pro Gly Glu His Ser  
35 40 45

Thr Asp Asn Asn Lys Thr Phe Pro Ser Ile Gln Ile Leu Asn Tyr Phe  
50 55 60

Gly Lys Val Lys Ile Arg Thr Thr Leu Val Thr Lys Asn Glu Pro Tyr  
65 70 75 80

Lys Pro His Pro His Asp Leu Val Gly Lys Gly Cys Arg Asp Gly Tyr  
85 90 95

Tyr Glu Ala Glu Phe Gly Pro Glu Arg Gln Val Leu Ser Phe Gln Asn  
100 105 110

Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Lys Asp Leu Lys Glu Ser Ile Ser  
115 120 125

Leu Arg Ile Ser Lys Lys Ile Asn Pro Phe Asn Val Pro Glu Glu Gln  
130 135 140

Leu His Asn Ile Asp Glu Tyr Asp Leu Asn Val Val Arg Leu Cys Phe  
145 150 155 160

Gln Ala Phe Leu Pro Asp Glu His Gly Asn Tyr Thr Leu Ala Leu Pro  
165 170 175

Pro Leu Ile Ser Asn Pro Ile Tyr Asp Asn Arg Ala Pro Asn Thr Ala  
180 185 190

Glu Leu Arg Ile Cys Arg Val Asn Lys Asn Cys Gly Ser Val Lys Gly  
195 200 205

Gly Asp Glu Ile Phe Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile  
210 215 220

Glu Val Arg Phe Val Leu Gly Asn Trp Glu Ala Lys Gly Ser Phe Ser  
225 230 235 240

Gln Ala Asp Val His Arg Gln Val Ala Ile Val Phe Arg Thr Pro Pro  
245 250 255

Phe Leu Gly Asp Ile Thr  
260

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 71:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 314 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 71:

15

Met Ser Asn Lys Lys Gln Ser Asn Arg Leu Thr Glu Gln His Lys Leu  
1 5 10 15

Ser Gln Gly Val Ile Gly Ile Phe Gly Asp Tyr Ala Lys Ala His Asp  
20 25 30

Leu Ala Val Gly Glu Val Ser Lys Leu Val Lys Lys Ala Leu Ser Asn  
35 40 45

Glu Tyr Pro Gln Leu Ser Phe Arg Tyr Arg Asp Ser Ile Lys Lys Thr  
50 55 60

Glu Ile Asn Glu Ala Leu Lys Lys Ile Asp Pro Asp Leu Gly Gly Thr  
65 70 75 80

Leu Phe Val Ser Asn Ser Ser Ile Lys Pro Asp Gly Gly Ile Val Glu  
85 90 95

Val Lys Asp Asp Tyr Gly Glu Trp Arg Val Val Leu Val Ala Glu Ala  
100 105 110

Lys His Gln Gly Lys Asp Ile Ile Asn Ile Arg Asn Gly Leu Leu Val  
115 120 125

Gly Lys Arg Gly Asp Gln Asp Leu Met Ala Ala Gly Asn Ala Ile Glu  
130 135 140

Arg Ser His Asn Ile Ser Glu Ile Ala Asn Phe Met Leu Ser Glu Ser  
145 150 155 160

His Phe Pro Tyr Val Leu Phe Leu Glu Gly Ser Asn Phe Leu Thr Glu  
165 170 175

Asn Ile Ser Ile Thr Arg Pro Asp Gly Arg Val Val Asn Leu Glu Tyr  
180 185 190

Asn Ser Gly Ser Glu Ser His Phe Pro Tyr Val Leu Phe Leu Glu Gly  
195 200 205

Ser Asn Phe Leu Thr Glu Asn Ile Ser Ile Thr Arg Pro Asp Gly Arg  
210 215 220

Val Val Asn Leu Glu Tyr Asn Ser Gly Ile Leu Asn Arg Leu Asp Arg  
225 230 235 240

Leu Thr Ala Ala Asn Tyr Gly Met Pro Ile Asn Ser Asn Leu Cys Ile  
245 250 255

Asn Lys Phe Val Asn His Lys Asp Lys Ser Ile Met Leu Gln Ala Ala  
260 265 270

Ser Ile Tyr Thr Gln Gly Asp Gly Arg Glu Trp Asp Ser Lys Ile Met  
275 280 285

Phe Glu Ile Met Phe Asp Ile Ser Thr Thr Ser Leu Arg Val Leu Gly  
290 295 300

Arg Asp Leu Phe Glu Gln Leu Thr Ser Lys  
305 310

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 72:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 17 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 72:

Cys Asp Thr Asp Asp Arg His Arg Ile Glu Glu Lys Arg Lys Arg Lys  
1 5 10 15

Thr

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 73:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 168 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

- 15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 73:

Gly Asp Pro Gly Lys Lys Lys Gln His Ile Cys His Ile Gln Gly Cys  
1 5 10 15

Gly Lys Val Tyr Gly Lys Thr Ser His Leu Arg Ala His Leu Arg Trp  
20 25 30

His Thr Gly Glu Arg Pro Phe Met Cys Thr Trp Ser Tyr Cys Gly Lys  
35 40 45

Arg Phe Thr Arg Ser Asp Glu Leu Gln Arg His Lys Arg Thr His Thr  
50 55 60

Gly Glu Lys Lys Phe Ala Cys Pro Glu Cys Pro Lys Arg Phe Met Arg  
65 70 75 80

Ser Asp His Leu Ser Lys His Ile Lys Thr His Gln Asn Lys Lys Gly  
85 90 95

Gly Pro Gly Val Ala Leu Ser Val Gly Thr Leu Pro Leu Asp Ser Gly  
100 105 110

Ala Gly ser Glu Gly Ser Gly Thr Ala Thr Pro Ser Ala Leu Ile Thr  
115 120 125

Thr Asn Met Val Ala Met Glu Ala Ile Cys Pro Glu Gly Ile Ala Arg  
130 135 140

Leu Ala Asn Ser Gly Ile Asn Val Met Gln Val Ala Asp Leu Gln Ser  
145 150 155 160

Ile Asn Ile Ser Gly Asn Gly Phe  
165

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 74:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 181 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 74:

Ser Gly Ile Val Pro Gln Leu Gln Asn Ile Val Ser Thr Val Asn Leu  
1 5 10 15  
Gly Cys Lys Leu Asp Leu Lys Thr Ile Ala Leu Arg Ala Arg Asn Ala  
20 25 30  
Glu Tyr Asn Pro Lys Arg Phe Ala Ala Val Ile Met Arg Ile Arg Glu  
35 40 45  
Pro Arg Thr Thr Ala Leu Ile Phe Ser Ser Gly Lys Met Val Cys Thr  
50 55 60  
Gly Ala Lys Ser Glu Glu Gln Ser Arg Leu Ala Ala Arg Lys Tyr Ala  
65 70 75 80  
Arg Val Val Gln Lys Leu Gly Phe Pro Ala Lys Phe Leu Asp Phe Lys  
85 90 95  
Ile Gln Asn Met Val Gly Ser Cys Asp Val Lys Phe Pro Ile Arg Leu  
100 105 110  
Glu Gly Leu Val Leu Thr His Gln Gln Phe Ser Ser Tyr Glu Pro Glu  
115 120 125  
Leu Phe Pro Gly Leu Ile Tyr Arg Met Ile Lys Pro Arg Ile Val Leu  
130 135 140  
Leu Ile Phe Val Ser Gly Lys Val Val Leu Thr Gly Ala Lys Val Arg  
145 150 155 160  
Ala Glu Ile Tyr Glu Ala Phe Glu Asn Ile Tyr Pro Ile Leu Lys Gly  
165 170 175  
Phe Arg Lys Thr Thr  
180

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 75:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 85 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

5

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 75:

10

Ser Cys Phe Ala Leu Ile Ser Gly Thr Ala Asn Gln Val Lys Cys Tyr  
1 5 10 15  
Arg Phe Arg Val Lys Lys Asn His Arg His Arg Tyr Glu Asn Cys Thr  
20 25 30  
Thr Thr Trp Phe Thr Val Ala Asp Asn Gly Ala Glu Arg Gln Gly Gln  
35 40 45  
Ala Gln Ile Leu Ile Thr Phe Gly Ser Pro Ser Gln Arg Gln Asp Phe  
50 55 60  
Leu Lys His Val Pro Leu Pro Pro Gly Met Asn Ile Ser Gly Phe Thr  
65 70 75 80  
Ala Ser Leu Asp Phe  
85

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 76:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 87 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

20

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 76:

25

Cys Pro Cys Leu Leu Ile Gly Thr Ser Gly Asn Gly Asn Gln Val Lys  
1 5 10 15  
Cys Tyr Ser Phe Arg Val Lys Arg Trp His Asp Arg Asp Lys Tyr His  
20 25 30

His Thr Thr Thr Trp Trp Ala Val Gly Gly Gln Gly Ser Glu Arg Pro  
35 40 45

Gly Asp Ala Thr Val Ile Val Thr Phe Lys Asp Gln Ser Gln Arg Ser  
50 55 60

His Phe Leu Gln Gln Val Pro Leu Pro Pro Gly Met Ser Ala His Gly  
65 70 75 80

Val Thr Met Thr Val Asp Phe  
85

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 77:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 84 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 77:

Pro Pro Val Ile Cys Leu Lys Gly Gly His Asn Gln Leu Lys Cys Leu  
1 5 10 15

Arg Tyr Arg Leu Lys Ser Lys His Ser Ser Leu Phe Asp Cys Ile Ser  
20 25 30

Thr Thr Trp Ser Trp Val Asp Thr Thr Ser Thr Cys Arg Leu Gly Ser  
35 40 45

Gly Arg Met Leu Ile Lys Phe Ala Asp Ser Glu Gln Arg Asp Lys Phe  
50 55 60

Leu Ser Arg Val Pro Leu Pro Ser Thr Thr Gln Val Phe Leu Gly Asn  
65 70 75 80

Phe Tyr Gly Leu

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 78:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 84 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 78:

Pro Pro Val Ile Leu Val Arg Gly Gly Ala Asn Thr Leu Lys Cys Phe  
1 5 10 15  
Arg Asn Arg Ala Arg Val Arg Tyr Arg Gly Leu Phe Lys Tyr Phe Ser  
20 25 30  
Thr Thr Trp Ser Trp Val Ala Gly Asp Ser Thr Glu Arg Leu Gly Arg  
35 40 45  
Ser Arg Met Leu Ile Leu Phe Thr Ser Ala Cys Gln Arg Glu Lys Pro  
50 55 60  
Asp Glu Thr Val Lys Tyr Pro Lys Gly Val Asp Thr Ser Tyr Gly Asn  
65 70 75 80

5

Leu Asp Ser Leu  
Pro Pro Val Val Cys Val Lys Gly Gly Ala Asn Gln Leu Lys Cys Leu  
1 5 10 15  
Arg Tyr Arg Leu Lys Ala Ser Thr Gln Val Asp Phe Asp Ser Ile Ser  
20 25 30  
Thr Thr Trp His Trp Thr Asp Arg Lys Asn Thr Glu Arg Ile Gly Ser  
35 40 45  
Ala Arg Met Leu Val Lys Phe Ile Asp Glu Ala Gln Arg Glu Lys Phe  
50 55 60  
Leu Glu Arg Val Ala Leu Pro Arg Ser Val Ser Val Phe Leu Gly Gln  
65 70 75 80  
Phe Asn Gly Ser

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 79:

10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 84 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

15

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO

20

- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 79:

Pro Pro Val Val Cys Val Lys Gly Gly Ala Asn Gln Leu Lys Cys Leu  
1 5 10 15  
Arg Tyr Arg Leu Lys Ala Ser Thr Gln Val Asp Phe Asp Ser Ile Ser  
20 25 30  
Thr Thr Trp His Trp Thr Asp Arg Lys Asn Thr Glu Arg Ile Gly Ser  
35 40 45  
Ala Arg Met Leu Val Lys Phe Ile Asp Glu Ala Gln Arg Glu Lys Phe  
50 55 60  
Leu Glu Arg Val Ala Leu Pro Arg Ser Val Ser Val Phe Leu Gly Gln  
65 70 75 80  
Phe Asn Gly Ser

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 80:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 84 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 80:

Thr Pro Ile Val Gln Leu Gln Gly Asp Ser Asn Cys Leu Lys Cys Phe  
1 5 10 15  
Arg Tyr Arg Leu Asn Asp Lys Tyr Lys His Leu Phe Glu Leu Ala Ser  
20 25 30  
Ser Thr Trp His Trp Ala Ser Pro Glu Ala Pro His Lys Asn Ala Ile  
35 40 45  
Val Thr Leu Thr Tyr Ser Ser Glu Glu Gln Arg Gln Gln Phe Leu Asn  
50 55 60  
Ser Val Lys Ile Pro Pro Thr Ile Arg His Lys Val Gly Phe Met Ser  
65 70 75 80  
Leu His Leu Leu

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 81:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 84 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 81:

Thr Pro Ile Val Gln Phe Gln Gly Glu Ser Asn Cys Leu Lys Cys Phe  
1 5 10 15

Arg Tyr Arg Leu Asn Arg Asp His Arg His Leu Phe Asp Leu Ile Ser  
20 25 30

Ser Thr Trp His Trp Ala Ser Ser Lys Ala Pro His Lys His Ala Ile  
35 40 45

Val Thr Val Thr Tyr Asp Ser Glu Glu Gln Arg Gln Gln Phe Leu Asp  
50 55 60

Val Val Lys Ile Pro Pro Thr Ile Ser His Lys Leu Gly Phe Met Ser  
65 70 75 80

Leu His Leu Leu

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 82:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15

(A) LONGITUD: 80 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

20

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 82:

25

Thr Pro Ile Ile His Leu Lys Gly Asp Arg Asn Ser Leu Lys Cys Leu  
1 5 10 15

Arg Tyr Arg Leu Arg Lys His Ser Asp His Tyr Arg Asp Ile Ser Ser  
20 25 30

Thr Trp His Trp Thr Gly Ala Gly Asn Glu Lys Thr Gly Ile Leu Thr  
35 40 45

Val Thr Tyr His Ser Glu Thr Gln Arg Thr Lys Phe Leu Asn Thr Val  
50 55 60

Ala Ile Pro Asp Ser Val Gln Ile Leu Val Gly Tyr Asn Thr Met Tyr  
65 70 75 80

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 83:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 80 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 83:

Thr Pro Ile Val His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Thr Leu Lys Cys Leu  
1 5 10 15

Arg Tyr Arg Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr Ala Val Ser Ser  
20 25 30

Thr Trp His Trp Thr Gly His Asn Tyr Lys His Lys Ser Ala Ile Val  
35 40 45

Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln Phe Leu Ser Gln  
50 55 60

Val Lys Ile Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly Phe Met Ser Ile  
65 70 75 80

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 84:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 81 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

30 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 84:

Ala Pro Ile Val His Leu Lys Gly Glu Ser Asn Ser Leu Lys Cys Leu  
1 5 10 15

Arg Tyr Arg Leu Lys Pro Tyr Asn Glu Leu Tyr Ser Ser Met Ser Ser  
20 25 30

1 The Val Asn gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Gln Ala Leu Tyr 15  
 5  
 20 Leu Val Cys Gly Arg Gly Phe Thr Tyr Thr Pro Lys Thr 25  
 30

30

- (ii) TIPO DE MOLECULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 86:

25

- (A) LONGITUD: 30 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 86:

1 Gly Ile Val Gln Gln Cys Cys Thr Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu 15  
 5  
 20 Gln Asn Tyr Cys Asn 20

15

- (ii) TIPO DE MOLECULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 85:

10

- (A) LONGITUD: 21 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 85:

35 Thr Trp His Trp Thr Ser Asp Asn Lys Asn Ser Lys Asn Gly Ile Val  
 40  
 45  
 50 Thr Val Thr Phe Val Thr Gly Gln Gln Met Phe Leu Gly Thr  
 55  
 60  
 65 Val Lys Ile Pro Pro Thr Val Gln Ile Ser Thr Gly Phe Met Thr Leu  
 70  
 75  
 80 Val

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 87:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 21 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 87:

**Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Ala Ser Val Cys Ser Leu Tyr Gln Leu**  
1 5 10 15

15 **Glu Asn Tyr Cys Asn**  
20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 88:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 30 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 88:

30 **Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr**  
1 5 10 15

**Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr**  
20 25 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 89:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 24 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 89:

Gln	Leu	Tyr	Ser	Ala	Leu	Ala	Asn	Lys	Cys	Cys	His	Val	Gly	Cys	Ile
1				5					10					15	

Lys	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Phe	Cys
			20				

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 90:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

- (A) LONGITUD: 33 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

15

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENtido: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 90:

Asp	Ser	Trp	Met	Glu	Glu	Val	Ile	Lys	Ile	Cys	Gly	Arg	Glu	Leu	Val
1				5					10					15	

Arg	Ala	Gln	Ile	Ala	Ile	Cys	Gly	Met	Ser	Thr	Trp	Ser	Lys	Arg	Ser
			20					25					30		

20

Leu

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 91:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25

- (A) LONGITUD: 24 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

30

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENtido: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 91:

35

Glu	Glu	Lys	Met	Gly	Thr	Ala	Lys	Lys	Cys	Cys	Ala	Ile	Gly	Cys	Ser
1				5					10					15	

Thr	Glu	Asp	Phe	Arg	Met	Val	Cys
			20				

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 92

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 40 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 92

Arg Pro Asn Trp Glu Glu Arg Ser Arg Leu Cys Gly Arg Asp Leu Ile  
1 5 10 15

Arg Ala Phe Ile Tyr Leu Cys Gly Gly Thr Arg Trp Thr Arg Leu Pro  
15 20 25 30

Asn Phe Gly Asn Tyr Pro Ile Met  
35 40

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 93:

- 20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 182 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- 30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 93:

Ser Gly Ile Val Pro Thr Leu Gln Asn Ile Val Ser Thr Val Asn Leu  
1 5 10 15

Asp Cys Lys Leu Asp Leu Lys Ala Ile Ala Leu Gln Ala Arg Asn Ala  
20 25 30

Glu Tyr Asn Pro Lys Arg Phe Ala Ala Val Ile Met Arg Ile Arg Glu  
35 40 45

Pro Lys Thr Thr Ala Leu Ile Phe Ala Ser Gly Lys Met Val Cys Thr  
50 55 60

Gly Ala Lys Ser Glu Asp Phe Ser Lys Met Ala Ala Arg Lys Tyr Ala  
65 70 75 80

Arg Ile Val Gln Lys Leu Gly Phe Pro Ala Lys Phe Lys Asp Phe Lys  
85 90 95

Ile Gln Asn Ile Val Gly Ser Cys Asp Val Lys Phe Pro Ile Arg Leu  
100 105 110

Glu Gly Leu Ala Tyr Ser His Ala Ala Phe Ser Ser Tyr Glu Pro Glu  
115 120 125

Leu Phe Pro Gly Leu Ile Tyr Arg Met Lys Val Pro Lys Ile Val Leu  
130 135 140

Leu Ile Phe Val Ser Gly Lys Ile Val Ile Thr Gly Ala Lys Met Arg  
145 150 155 160

Asp Glu Thr Tyr Lys Ala Phe Glu Asn Ile Tyr Pro Val Leu Ser Glu  
165 170 175

Phe Arg Lys Ile Gln Gln  
180

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 94:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 84 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 94:

Asn Ser Asn Ser Thr Pro Ile Val His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Thr  
1 5 10 15

Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr  
20 25 30

Ala Val Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys  
35 40 45

Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln  
50 55 60

Phe Leu Ser Gln Val Lys Ile Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly  
65 70 75 80

Phe Met Ser Ile

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 95:

20

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 84 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

5

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 95:

10

Asn Ser Asn Thr Thr Pro Ile Val His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Thr  
1 5 10 15  
Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr  
20 25 30  
Ala Val Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys  
35 40 45  
Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln  
50 55 60  
Phe Leu Ser Gln Val Lys Ile Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly  
65 70 75 80  
Phe Met Ser Ile

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 96:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 83 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

20

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 96:

25

Ser Gly Asn Thr Thr Pro Ile Ile His Leu Lys Gly Asp Arg Asn Ser  
1 5 10 15  
Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Leu Arg Lys His Ser Asp His Tyr Arg  
20 25 30  
Asp Ile Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly Ala Gly Asn Glu Lys Thr  
35 40 45

30

Gly Ile Leu Thr Val Thr Tyr His Ser Glu Thr Gln Arg Thr Lys Phe  
50 55 60

Leu Asn Thr Val Ala Ile Pro Asp Ser Val Gln Ile Leu Val Gly Tyr  
65 70 75 80

Met Thr Met

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 97:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 84 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 97:

Ser Gly Asn Thr Ala Pro Ile Val His Leu Lys Gly Glu Ser Asn Ser  
1 5 10 15

Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Leu Lys Pro Tyr Lys Glu Leu Tyr Ser  
20 25 30

Ser Met Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Ser Asp Asn Lys Asn Ser Lys  
35 40 45

Asn Gly Ile Val Thr Val Thr Phe Val Thr Glu Gln Gln Gln Met  
50 55 60

Phe Leu Gly Thr Val Lys Ile Pro Pro Thr Val Gln Ile Ser Thr Gly  
65 70 75 80

Phe Met Thr Leu

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 98:

20

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 89 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

25

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 98:

Ser Gly Asn Thr Ser Cys Phe Ala Leu Ile Ser Gly Thr Ala Asn Gln  
1 5 10 15  
Val Lys Cys Tyr Arg Phe Arg Val Lys Lys Asn His Arg His Arg Tyr  
20 25 30  
Glu Asn Cys Thr Thr Thr Trp Phe Thr Val Ala Asp Asn Gly Ala Glu  
35 40 45  
Arg Gln Gly Gln Ala Gln Ile Leu Ile Thr Phe Gly Ser Pro Ser Gln  
50 55 60  
Arg Gln Asp Phe Leu Lys His Val Pro Leu Pro Pro Gly Met Asn Ile  
65 70 75 80  
Ser Gly Phe Thr Ala Ser Leu Asp Phe  
85

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 99:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 7 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

- 15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: C-terminal  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 99:

20 Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala  
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 100:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 4 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

- 30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 100:

35

**Asn Ser Asn Thr**  
1

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 101:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 4 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
  - (iv) ANTISENTIDO: NO
  - (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- 15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 101:

**Ser Gly Asn Thr**  
1

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 102:

- 20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
  - (iv) ANTISENTIDO: NO
  - (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- 30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 102:

**Ser Ser Gly Ser Ser Gly**  
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 103:

- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 15 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
  - (iv) ANTISENTIDO: NO
  - (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
- 45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 103:

**Cys Tyr Pro Glu Ile Lys Asp Lys Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg**  
1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 104:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 66 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 104:

**Met Glu Gln Arg Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln**  
1 5 10 15

**Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys**  
20 25 30

**Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly**  
35 40 45

**Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr**  
50 55 60

**Thr Ala**  
65

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 105:

20

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 66 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 105:

**Met Glu Gln Glu Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln**  
1 5 10 15

Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys  
                  20                                  25                                  30

Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly  
          35                                  40                                  45

Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr  
      50                                  55                                  60

Thr Ala  
65

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 106:

- 5           (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 66 aminoácidos  
              (B) TIPO: aminoácido  
              (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 10           (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína  
              (iii) HIPOTÉTICA: NO  
              (iv) ANTISENTIDO: NO  
              (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- 15           (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 106:

Met Arg Gln Arg Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln  
1                  5                                  10                                  15

Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys  
                  20                                  25                                  30

Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly  
          35                                  40                                  45

Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr  
      50                                  55                                  60

Thr Ala  
65

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 107:

- 20           (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 96 aminoácidos  
              (B) TIPO: aminoácido  
              (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 25           (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido  
              (iii) HIPOTÉTICA: NO  
              (iv) ANTISENTIDO: NO

- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 107:

Ser Thr Lys Lys Lys Pro Leu Thr Gln Glu Gln Leu Glu Asp Ala Arg  
1 5 10 15  
Arg Leu Lys Ala Ile Tyr Glu Lys Lys Lys Asn Glu Leu Gly Leu Ser  
20 25 30  
Gln Glu Ser Val Ala Asp Lys Met Gly Met Gly Gln Ser Gly Val Gly  
35 40 45  
Ala Leu Phe Asn Gly Ile Asn Ala Leu Asn Ala Tyr Asn Ala Ala Leu  
50 55 60  
Leu Ala Lys Ile Leu Lys Val Ser Val Glu Glu Phe Ser Pro Ser Ile  
65 70 75 80  
Ala Arg Glu Ile Tyr Glu Met Tyr Glu Ala Val Ser Met Glu Pro Ser  
85 90 95

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 108:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

- (A) LONGITUD: 96 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

15

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 108:

Ser Thr Lys Lys Lys Pro Leu Thr Gln Glu Gln Leu Glu Asp Ala Arg  
1 5 10 15  
Arg Leu Lys Ala Ile Tyr Glu Lys Lys Lys Asn Glu Leu Gly Leu Ser  
20 25 30  
Gln Glu Ser Val Ala Asp Lys Met Gly Met Gly Gln Ser Gly Val Gly  
35 40 45  
Ala Leu Phe Asn Gly Ile Asn Ala Leu Asn Ala Tyr Asn Ala Ala Leu  
50 55 60  
Leu Ala Lys Ile Leu Lys Val Ser Val Glu Glu Phe Ser Pro Ser Ile  
65 70 75 80  
Ala Arg Glu Ile Tyr Glu Met Cys Glu Ala Val Ser Met Glu Pro Ser  
85 90 95

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 109:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 180 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 109:

Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Gln	Leu		
1				5					10					15			
Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn	Met	Ser	Met	Glu	Gln	Arg	Ile	Thr	Leu	Lys	Asp		
			20					25					30				
Tyr	Ala	Met	Arg	Phe	Gly	Gln	Thr	Lys	Thr	Ala	Lys	Asp	Leu	Gly	Val		
		35					40					45					
Tyr	Gln	Ser	Ala	Ile	Asn	Lys	Ala	Ile	His	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile	Phe		
	50					55					60						
Leu	Thr	Ile	Asn	Ala	Asp	Gly	Ser	Val	Tyr	Ala	Glu	Glu	Val	Lys	Pro		
65					70					75					80		
Phe	Pro	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr	Thr	Ala	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr	Thr	Ala		
				85					90						95		
Asn	Ser	Asn	Thr	Thr	Pro	Ile	Val	His	Leu	Lys	Gly	Asp	Ala	Asn	Thr		
			100					105						110			
Leu	Lys	Cys	Leu	Arg	Tyr	Arg	Phe	Lys	Lys	His	Cys	Thr	Leu	Tyr	Thr		
		115					120					125					
Ala	Val	Ser	Ser	Thr	Trp	His	Trp	Thr	Gly	His	Asn	Val	Lys	His	Lys		
		130				135					140						
Ser	Ala	Ile	Val	Thr	Leu	Thr	Tyr	Asp	Ser	Glu	Trp	Gln	Arg	Asp	Gln		
145					150					155					160		
Phe	Leu	Ser	Gln	Val	Lys	Ile	Pro	Lys	Thr	Ile	Thr	Val	Ser	Thr	Gly		
				165					170						175		
Phe	Met	Ser	Ile														
			180														

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 110:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

(A) LONGITUD: 113 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

- 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal  
10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 110:

Gly Ile Val Glu Gln cys cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu  
1 5 10 15  
Glu Asn Tyr Cys Asn Met Ser Met Glu Gln Arg Ile Thr Leu Lys Asp  
20 25 30  
Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val  
35 40 45  
Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe  
50 55 60  
Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro  
65 70 75 80  
Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala  
85 90 95  
Cys Asp Thr Asp Asp Arg His Arg Ile Glu Glu Lys Arg Lys Arg Lys  
100 105 110  
Thr

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 111:

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 292 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
20 (D) CONFIGURACIÓN: lineal  
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína  
(iii) HIPOTÉTICA: NO  
(iv) ANTISENTIDO: NO  
(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal  
25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 111:

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
1 5 10 15  
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Met Ser  
20 25 30

Met Glu Gln Glu Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln  
35 40 45

Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys  
50 55 60

Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly  
65 70 75 80

Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr  
85 90 95

Thr Ala Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser  
100 105 110

Gly Ile Val Pro Gln Leu Gln Asn Ile Val Ser Thr Val Asn Leu Gly  
115 120 125

Cys Lys Leu Asp Leu Lys Thr Ile Ala Leu Arg Ala Arg Asn Ala Glu  
130 135 140

Tyr Asn Pro Lys Arg Phe Ala Ala Val Ile Met Arg Ile Arg Glu Pro  
145 150 155 160

Arg Thr Thr Ala Leu Ile Phe Ser Ser Gly Lys Met Val Cys Thr Gly  
165 170 175

Ala Lys Ser Glu Glu Gln Ser Arg Leu Ala Ala Arg Lys Tyr Ala Arg  
180 185 190

Val Val Gln Lys Leu Gly Phe Pro Ala Lys Phe Leu Asp Phe Lys Ile  
195 200 205

Gln Asn Met Val Gly Ser Cys Asp Val Lys Phe Pro Ile Arg Leu Glu  
210 215 220

Gly Leu Val Leu Thr His Gln Gln Phe Ser Ser Tyr Glu Pro Glu Leu  
225 230 235 240

Phe Pro Gly Leu Ile Tyr Arg Met Ile Lys Pro Arg Ile Val Leu Leu  
245 250 255

Ile Phe Val Ser Gly Lys Val Val Leu Thr Gly Ala Lys Val Arg Ala  
260 265 270

Glu Ile Tyr Glu Ala Phe Glu Asn Ile Tyr Pro Ile Leu Lys Gly Phe  
275 280 285

Arg Lys Thr Thr  
290

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 112:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 273 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

5

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 112:

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
1 5 10 15  
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Met Ser  
20 25 30  
Met Arg Gln Arg Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln  
35 40 45  
Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys  
50 55 60  
Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly  
65 70 75 80  
Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr  
85 90 95  
Thr Ala Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala Gly Asp Pro Gly Lys Lys Lys  
100 105 110  
Gln His Ile Cys His Ile Gln Gly Cys Gly Lys Val Tyr Gly Lys Thr  
115 120 125  
Ser His Leu Arg Ala His Leu Arg Trp His Thr Gly Glu Arg Pro Phe  
130 135 140  
Met Cys Thr Trp Ser Tyr Cys Gly Lys Arg Phe Thr Arg Ser Asp Glu  
145 150 155 160  
Leu Gln Arg His Lys Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Lys Phe Ala Cys  
165 170 175  
Pro Glu Cys Pro Lys Arg Phe Met Arg Ser Asp His Leu Ser Lys His  
180 185 190  
Ile Lys Thr His Gln Asn Lys Lys Gly Gly Pro Gly Val Ala Leu Ser  
195 200 205  
Val Gly Thr Leu Pro Leu Asp Ser Gly Ala Gly Ser Glu Gly Ser Gly  
210 215 220  
Thr Ala Thr Pro Ser Ala Leu Ile Thr Thr Asn Met Val Ala Met Glu  
225 230 235 240

10

Ala Ile Cys Pro Glu Gly Ile Ala Arg Leu Ala Asn Ser Gly Ile Asn  
245 250 255

Val Met Gln Val Ala Asp Leu Gln Ser Ile Asn Ile Ser Gly Asn Gly  
260 265 270

Phe

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 113:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 421 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO

15

- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 113:

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Ile  
1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Met Ser Met Arg Gln Arg Ile Thr  
20 25 30

Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln Thr Lys Thr Ala Lys Asp  
35 40 45

Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys Ala Ile His Ala Gly Arg  
50 55 60

Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly Ser Val Tyr Ala Glu Glu  
65 70 75 80

Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala Ser Asn Lys Lys  
85 90 95

Thr Thr Ala Met Ala Asp Asp Asp Pro Tyr Gly Thr Gly Gln Met Phe  
100 105 110

His Leu Asn Thr Ala Leu Thr His Ser Ile Phe Asn Ala Glu Leu Tyr  
115 120 125

Ser Pro Glu Ile Pro Leu Ser Thr Asp Gly Pro Tyr Leu Gln Ile Leu  
130 135 140

Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys Glu Gly  
145 150 155 160

Pro Ser His Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn Lys Lys  
165 170 175

Ser Tyr Pro Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala Lys Val  
180 185 190

Ile Val Gln Leu Val Thr Asn Gly Lys Asn Ile His Leu His Ala His  
195 200 205

Ser Leu Val Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Val Cys Thr Val Thr Ala  
210 215 220

Gly Pro Lys Asp Met Val Val Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile Leu His  
225 230 235 240

Val Thr Lys Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met Thr Glu  
245 250 255

Ala Cys Ile Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Ser Asp Leu  
260 265 270

Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Thr Asp Arg  
275 280 285

Glu Lys Glu Ile Ile Arg Gln Ala Ala Val Gln Gln Thr Lys Glu Met  
290 295 300

Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro Asp Ser  
305 310 315 320

Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp Ala Ile  
325 330 335

Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val Arg Met  
340 345 350

Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr Leu Leu  
355 360 365

Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr Glu Glu  
370 375 380

Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser Pro Thr  
385 390 395 400

Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys  
405 410 415

Asp Val Asn Ile Thr  
420

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 114:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 391 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido  
(D) CONFIGURACIÓN: lineal

5

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 114:

Met Arg Gln Arg Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys  
20 25 30

Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly  
35 40 45

Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr  
50 55 60

Thr Ala Met Ala Glu Asp Asp Pro Tyr Leu Gly Arg Pro Glu Gln Met  
65 70 75 80

Phe His Leu Asp Pro Ser Leu Thr His Thr Ile Phe Asn Pro Glu Val  
85 90 95

Phe Gln Pro Gln Met Ala Leu Pro Thr Ala Asp Gly Pro Tyr Leu Gln  
100 105 110

Ile Leu Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys  
115 120 125

Glu Gly Pro Ser His Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn  
130 135 140

Lys Lys Ser Tyr Pro Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala  
145 150 155 160

Lys Val Ile Val Gln Leu Val Thr Asn Gly Lys Asn Ile His Leu His  
165 170 175

Ala His Ser Leu Val Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Ile Cys Thr Val  
180 185 190

Thr Ala Gly Pro Glu Asp Cys Val His Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile  
195 200 205

Leu His Val Thr Lys Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met  
210 215 220

Thr Glu Ala Cys Ile Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Pro  
225 230 235 240

10

Asp Leu Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Gly  
245 250 255

Asp Arg Glu Lys Glu Leu Ile Arg Gln Ala Ala Leu Gln Gln Thr Lys  
260 265 270

Glu Met Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro  
275 280 285

Asp Ser Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp  
290 295 300

Ala Ile Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val  
305 310 315 320

Arg Met Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr  
325 330 335

Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr  
340 345 350

Glu Glu Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser  
355 360 365

Pro Thr Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys  
370 375 380

Tyr Lys Asp Ile Asn Ile Thr  
385 390

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 115:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 391 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 115:

Met Glu Gln Glu Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys  
20 25 30

Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly  
35 40 45

Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr  
50 55 60

Thr Ala Met Ala Glu Asp Asp Pro Tyr Leu Gly Arg Pro Glu Gln Met  
65 70 75 80

Phe His Leu Asp Pro Ser Leu Thr His Thr Ile Phe Asn Pro Glu Val  
85 90 95

Phe Gln Pro Gln Met Ala Leu Pro Thr Ala Asp Gly Pro Tyr Leu Gln  
100 105 110

Ile Leu Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys  
115 120 125

Glu Gly Pro Ser His Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn  
130 135 140

Lys Lys Ser Tyr Pro Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala  
145 150 155 160

Lys Val Ile Val Gln Leu Val Thr Asn Gly Lys Asn Ile His Leu His  
165 170 175

Ala His Ser Leu Val Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Ile Cys Thr Val  
180 185 190

Thr Ala Gly Pro Glu Asp Cys Val His Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile  
195 200 205

Leu His Val Thr Lys Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met  
210 215 220

Thr Glu Ala Cys Ile Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Pro  
225 230 235 240

Asp Leu Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Gly  
245 250 255

Asp Arg Glu Lys Glu Leu Ile Arg Gln Ala Ala Leu Gln Gln Thr Lys  
260 265 270

Glu Met Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro  
275 280 285

Asp Ser Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp  
290 295 300

Ala Ile Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val  
305 310 315 320

Arg Met Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr  
325 330 335

Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr  
340 345 350

Glu Glu Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser  
355 360 365  
Pro Thr Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys  
370 375 380  
Tyr Lys Asp Ile Asn Ile Thr  
385 390

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 116:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 241 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
  - (iv) ANTISENTIDO: NO
  - (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- 15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 116:

Met Arg Gln Arg Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln  
1 5 10 15  
Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys  
20 25 30  
Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly  
35 40 45  
Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr  
50 55 60  
Thr Ala Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala Gly Asp Pro Gly Lys Lys Lys  
65 70 75 80  
Gln His Ile Cys His Ile Gln Gly Cys Gly Lys Val Tyr Gly Lys Thr  
85 90 95  
Ser His Leu Arg Ala His Leu Arg Trp His Thr Gly Glu Arg Pro Phe  
100 105 110  
Met Cys Thr Trp Ser Tyr Cys Gly Lys Arg Phe Thr Arg Ser Asp Glu  
115 120 125  
Leu Gln Arg His Lys Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Lys Phe Ala Cys  
130 135 140  
Pro Glu Cys Pro Lys Arg Phe Met Arg Ser Asp His Leu Ser Lys His  
145 150 155 160  
Ile Lys Thr His Gln Asn Lys Lys Gly Gly Pro Gly Val Ala Leu Ser  
165 170 175

Val Gly Thr Leu Pro Leu Asp Ser Gly Ala Gly Ser Glu Gly Ser Gly  
180 185 190

Thr Ala Thr Pro Ser Ala Leu Ile Thr Thr Asn Met Val Ala Met Glu  
195 200 205

Ala Ile Cys Pro Glu Gly Ile Ala Arg Leu Ala Asn Ser Gly Ile Asn  
210 215 220

Val Met Gln Val Ala Asp Leu Gln Ser Ile Asn Ile Ser Gly Asn Gly  
225 230 235 240

Phe

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 117:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 10 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: ambas
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 117:

15

GGGAMTNYCC

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 118:

20

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 72 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

25

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 118:

30

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala His Gln Asn Ser Gln Thr  
50 55 60

His Gln Ala Ser Leu Ser Lys Gln  
65 70

Reivindicaciones

1. Ácido nucleico sonda (PNA) que comprende dos secuencias diferentes que son:

5 (a) una secuencia monocatenaria (1/2 TBR) que puede formar, en condiciones de hibridación, un híbrido (TBR) con un ácido nucleico diana (TNA); y

10 (c) una secuencia monocatenaria (1/2 BBR) que puede formar, en condiciones de hibridación, un híbrido (BBR) con una secuencia monocatenaria presente en un ácido nucleico de refuerzo (BNA);

15 en el que dicha TBR es capaz de unirse con gran afinidad a una sustancia (TBA) capaz de discriminar entre un híbrido emparejado (TBR) y un híbrido con nucleótidos no emparejados, y en el que dicha BBR es capaz de unirse con gran afinidad a una sustancia (BBA) capaz de discriminar entre un híbrido emparejado (BBR) y un híbrido con nucleótidos no emparejados.

20 2. PNA según la reivindicación 1, en el que la TBR está constituida por uno o más lugares de reconocimiento para una proteína que se une al ácido nucleico, una proteína que se une al ADN, una proteína que se une al híbrido ADN-ARN o una proteína que se une al ARN.

25 3. PNA según la reivindicación 2, en el que la TBR es un lugar de reconocimiento de la proteína que se une al ácido nucleico presente en el genoma de un patógeno o es un lugar de unión asociado a un estado patogénico en un genoma de vertebrado o es un lugar de reconocimiento de la proteína que se une al ácido nucleico presente en el genoma de un organismo que contamina un proceso de fermentación.

30 4. PNA según la reivindicación 2, en el que la TBR es la VIH-LTR o una parte de la misma.

35 5. Método para detectar o localizar una secuencia específica de TNA, que comprende las etapas siguientes:

40 (a) hibridar dicho TNA con el PNA según la reivindicación 1;

(b) hibridar dicho PNA con el BNA que contiene una 1/2 BBR cuya secuencia es complementaria de la secuencia 1/2 BBR en el PNA;

45 (c) añadir los productos de las etapas (a) y (b) que contienen una TBR y una BBR, a una superficie, líquido u otro medio que contiene un TBA;

(d) añadir los BBA a la mezcla en la etapa (c) en el que dicho BBA comprende:

(i) una molécula o una parte de una molécula que puede unirse selectivamente a una BBR;

(ii) un indicador detectable; y

5

(e) detectar la señal producida por el indicador unido al BBA.

10

6. Método según la reivindicación 5, en el que dicho indicador es una proteína, que comprende enzimas capaces de catalizar las reacciones que conducen a la producción de productos de reacción coloreados; un radionucleido; perlas coloreadas.

15

7. Método *in vitro* de ampliación de la señal obtenida mediante la unión del PNA según la reivindicación 1 a un TNA, que comprende unir los BNA al híbrido PNA-TNA y unir los BBA marcados a los BNA.

20

8. Método para detectar o localizar secuencias específicas de ácido nucleico con un alto grado de sensibilidad y especificidad que comprende:

25

(a) añadir los PNA según la reivindicación 1, que contienen una 1/2 BBR y una 1/2 TBR, a una muestra que contiene o se sospecha que contiene los TNA que contienen las secuencias 1/2 TBR, para formar un complejo que presenta zonas de unión a la diana, TBR, formadas por la hibridación de las 1/2 TBR complementarias presentes en los PNA y TNA respectivamente;

30

(b) unir las TBR formadas en la etapa (a) a un TBA inmovilizado para formar un complejo TBA-TNA-PNA;

35

(c) añadir los ácidos nucleicos de refuerzo, BNA, que contienen zonas de unión de refuerzo, 1/2 BBR, al complejo formado en la etapa (b) de manera que las 1/2 BBR en los BNA se hibridan con las secuencias de 1/2 BBR presentes en los PNA o a las 1/2 BBR presentes en los BNA ya unidos al PNA, para formar las BBR, de manera que se forman los complejos TBA-TNA-PNA-(BNA)<sub>n</sub>;

40

(d) añadir los ácidos nucleicos en horquilla, HNA, que contienen secuencias de 1/2 BBR, al complejo formado en la etapa (c) de manera que las 1/2 BBR en los HNA se hibridan con algunas secuencias de 1/2 BBR presentes en los BNA del complejo de la etapa (c), coronando así la ampliación de los BNA en los complejos TBA-TNA-PNA-(BNA)<sub>n</sub> de la etapa (c) para formar los complejos TBA-TNA-PNA-(BNA)<sub>n</sub>-HNA;

45

(e) añadir los montajes de unión al refuerzo, BBA, unidos a fracciones indicadoras, a los complejos TBA-TNA-PNA-(BNA)<sub>n</sub>-HNA formados en la etapa (d) para formar los complejos TBA-TNA-PNA-(BNA-BBA)<sub>n</sub>-HNA; y

(f) detectar las señales producidas por las fracciones indicadoras unidas a los TBA, PNA, BNA, BBA o HNA en los complejos TBA-TNA-PNA-(BNA-BBA)<sub>n</sub>-HNA de la etapa (e);

en el que el TNA comprende:

- 5 (i) una o más secuencias de ácido nucleico 1/2 TBR específicas, cuya presencia o ausencia en una muestra determinada debe confirmarse;

el BNA comprende:

- 10 (i) una 1/2 BBR, como se muestra en la Figura 1(IIb), que presenta una secuencia que es complementaria a una secuencia 1/2 BBR en un PNA y que es capaz de formar, en condiciones de hibridación, un híbrido, BBR, con el PNA;

- 15 (ii) un OSA, que es un soporte no acoplado o indicador o un soporte acoplado u otros medios de localización, que comprenden, pero no se limitan a, acoplamiento a perlas, polímeros y superficies, y/o indicadores;

- (iii) lugares hibridación adicionales, 1/2 BBR, para otros BNA; y

- 20 (iv) secuencias, 1/2 BBR, que pueden hibridarse a los BNA ya hibridados a los PNA;

el BBA comprende:

- 25 (i) una molécula o una parte de una molécula que puede unirse selectivamente a una BBR; y

- (ii) un OSA, que es un soporte y/o indicador no acoplados o un soporte acoplado u otros medios de localización, que comprenden, pero no se limitan a, acoplamiento a perlas, polímeros y superficies, y/o indicadores;

30 y el TBA comprende:

- (i) una molécula o una parte de una molécula que puede unirse selectivamente a una TBR; y

- 35 (ii) soporte y/o indicador no acoplados o un soporte acoplado u otros medios de localización, que comprenden, pero no se limitan a, acoplamiento a perlas, polímeros y superficies, y/o indicadores.

40 9. Método de hibridación en fase sólida para detectar la presencia de un polinucleótido diana utilizando un PNA según la reivindicación 1, que implica: inmovilizar un polinucleótido diana, si está presente en una muestra de ensayo, directamente o mediante una estructura de captura intermedia, en una fase sólida en un lugar de captura; antes, durante o después de dicha inmovilización, acoplar un marcador detectable a dicho polinucleótido diana, si está presente; y detectar dicho marcador, si existe, en dicho lugar de  
45 captura; en el que la inmovilización comprende la utilización de un montaje de unión a la diana (TBA) que se une solamente a un híbrido único del ácido nucleico diana y un ácido nucleico sonda (PNA) que comprende una 1/2 BBR capaz de unirse a un ácido nucleico de refuerzo (BNA) que contiene una 1/2 BBR complementaria monocatenaria que, en la

hibridación con la 1/2 BBR en el PNA, forma una BBR que puede unirse a los montajes de unión al refuerzo (BBA) marcados, en el que los términos TBA, BNA, BBR y BNA son tal como se definen en la reivindicación 1.

5

10. Kit de análisis de diagnóstico o forense para la detección de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra de ácido nucleico, que comprende las primera y segunda sondas de ácido nucleico y las primera y segunda proteínas de unión al ácido nucleico,

10

en el que primera sonda presenta una secuencia complementaria de la secuencia diana y de la secuencia adicional;

15

la primera proteína de unión es específica para la primera duplicidad sonda-diana;

la segunda sonda es complementaria de la secuencia adicional en la primera sonda;  
y

20

la segunda proteína de unión se une específicamente a la duplicidad primera sonda-segunda sonda y está marcada con un marcador detectable.

25

11. Kit según la reivindicación 10, en el que la primera sonda es complementaria de la LTR del VIH y, en la hibridación de la primera sonda con la LTR del VIH, se forma un lugar de unión para NF-kB o una unidad del mismo, SP1, la proteína de unión a TATA, VIH-Detect I, II, III o IV o VIH-Lock.

30

12. Kit según la reivindicación 11, en el que la primera proteína de unión es NF-kB o una subunidad del mismo, SP1, la proteína de unión a TATA, VIH-Detect I, II, III o IV o VIH-Lock.

35

13. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la primera sonda, además de ser complementaria de la LTR del VIH, comprende una secuencia que codifica el operador izquierdo o derecho del bacteriófago lambda y la segunda sonda comprende la secuencia complementaria de dicha secuencia del operador izquierdo o derecho del bacteriófago lambda, de manera que en la hibridación de las primera y segunda sondas, se forma un lugar de unión para la proteína del represor CI del bacteriófago lambda, para la proteína *cro* del bacteriófago lambda o para un derivado u homólogo de las mismas.

40

45

14. Kit según la reivindicación 13, en el que la segunda proteína de unión es la proteína del represor CI del bacteriófago lambda, la proteína *cro* del bacteriófago lambda o un derivado u homólogo de las mismas.

---  
(En el mencionado fascículo siguen las versiones en alemán y en francés, respectivamente, de las mismas reivindicaciones que se han traducido de la versión en inglés).  
---

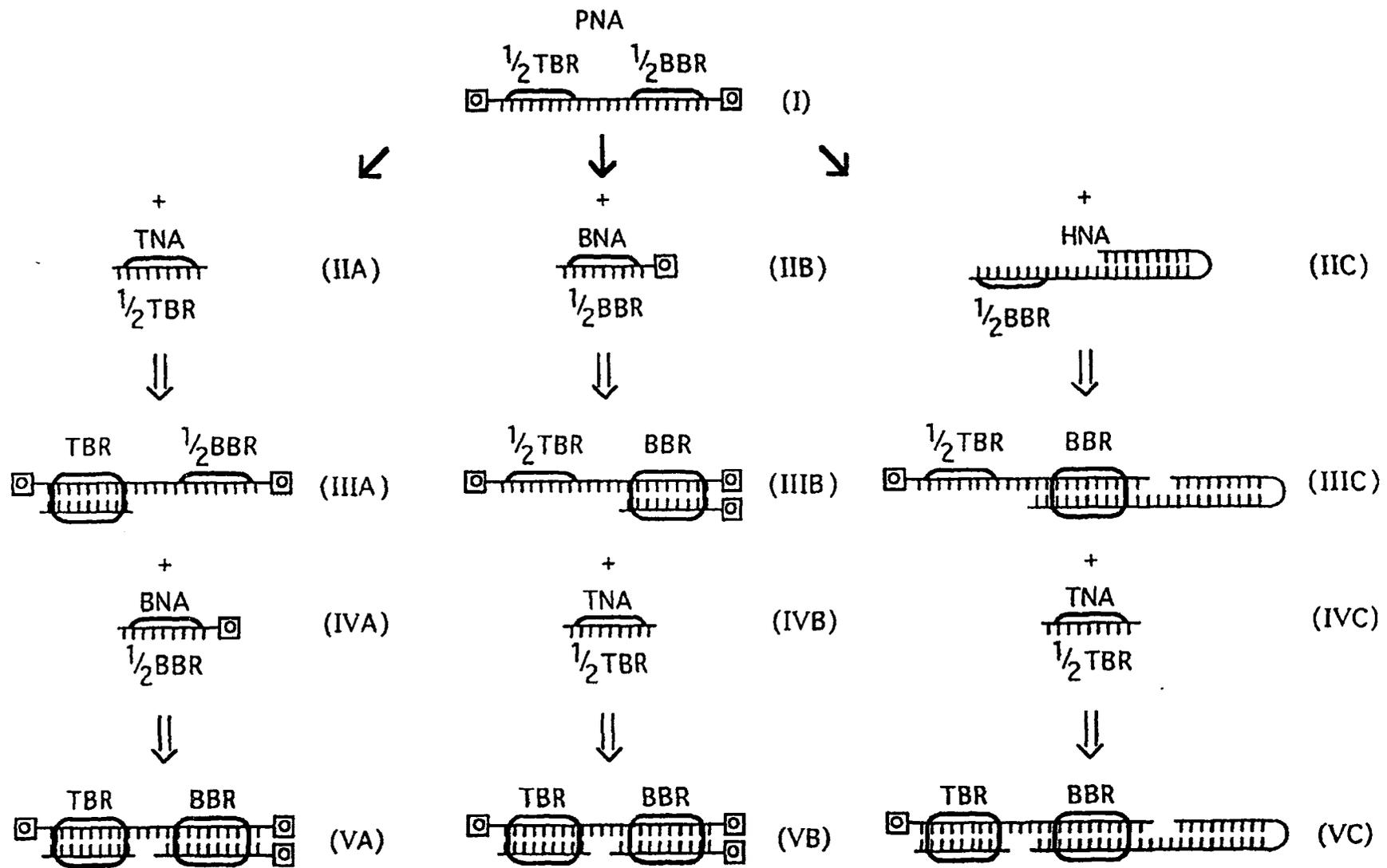


FIGURA 1

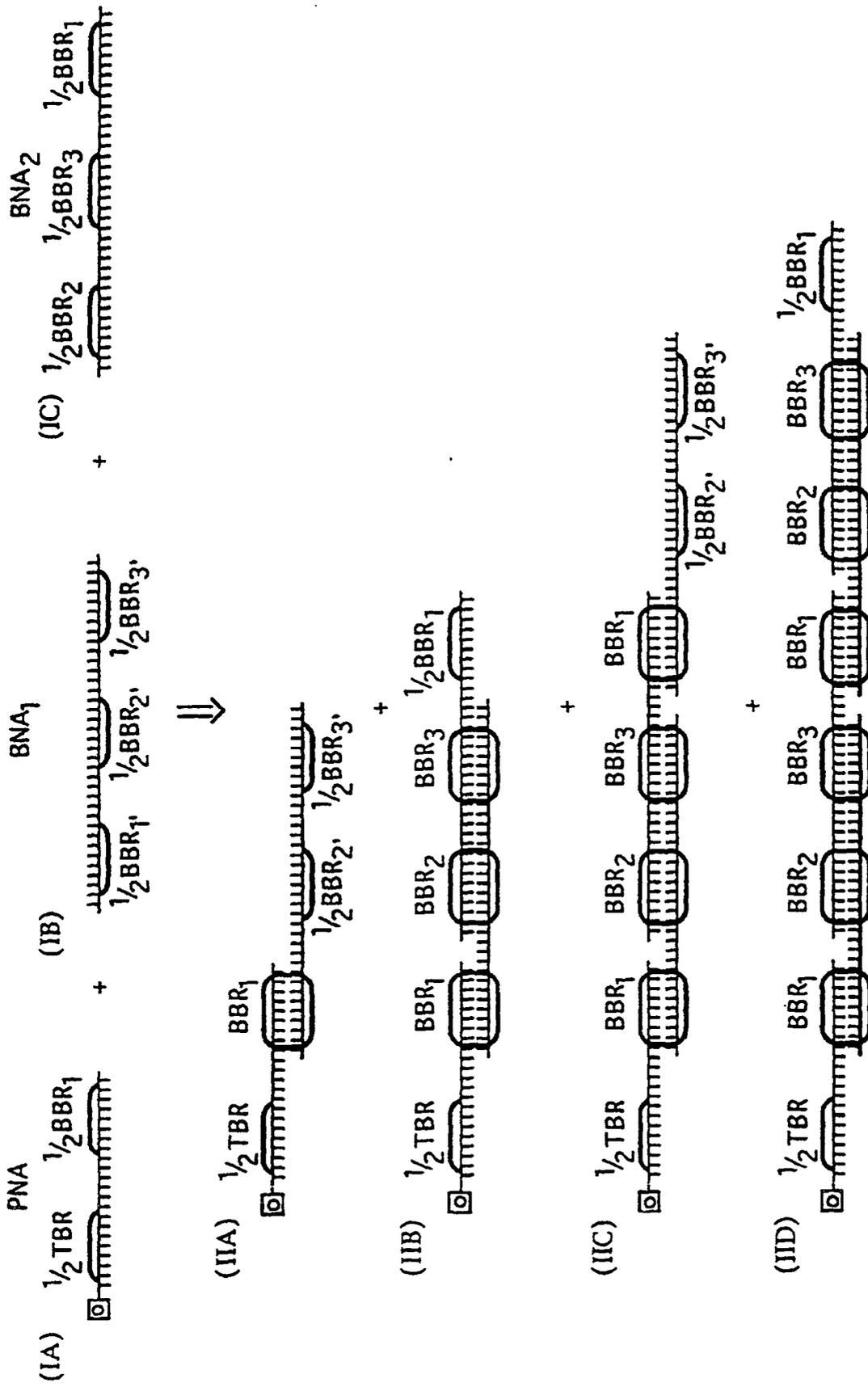


FIGURA 2A

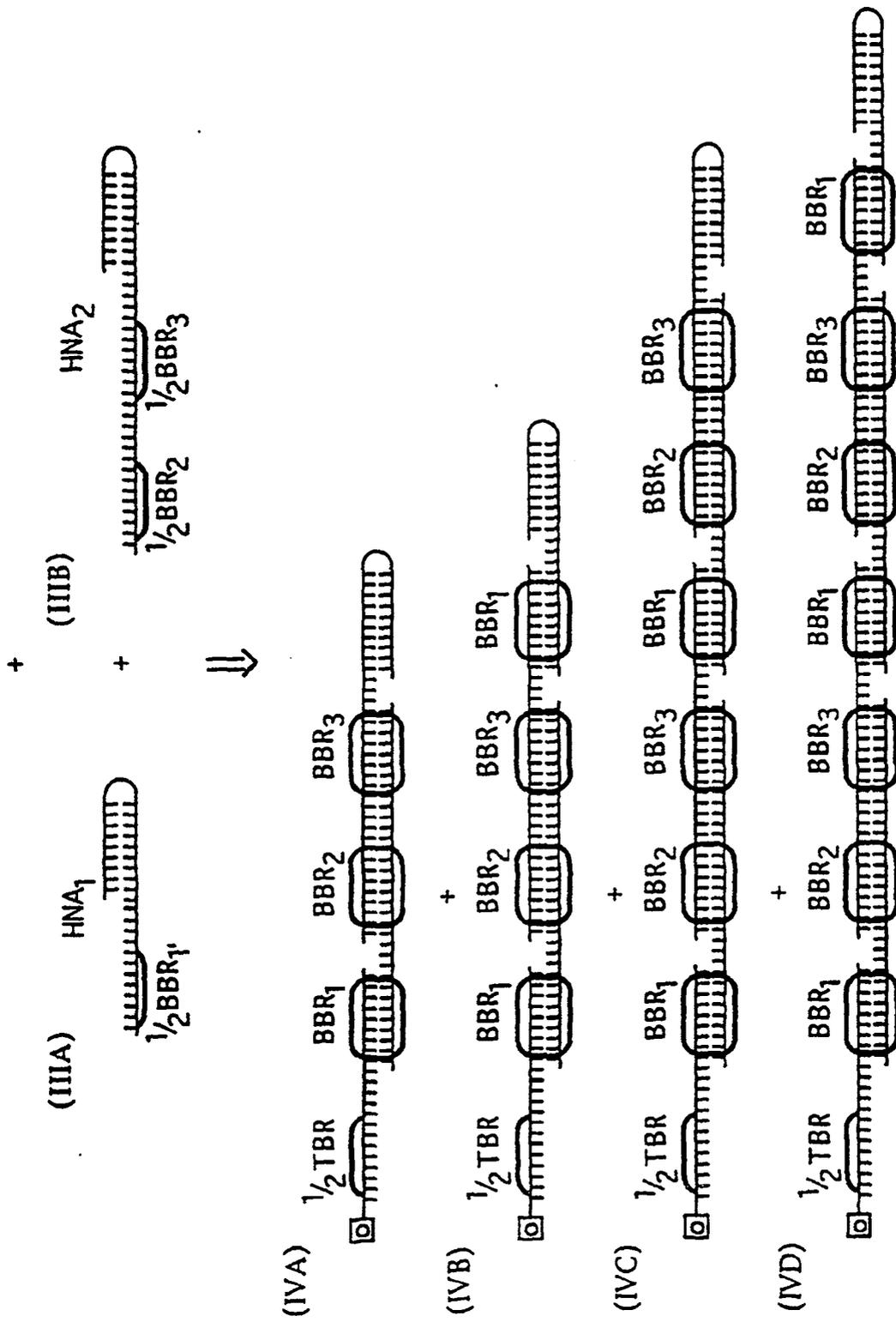


FIGURA 2B

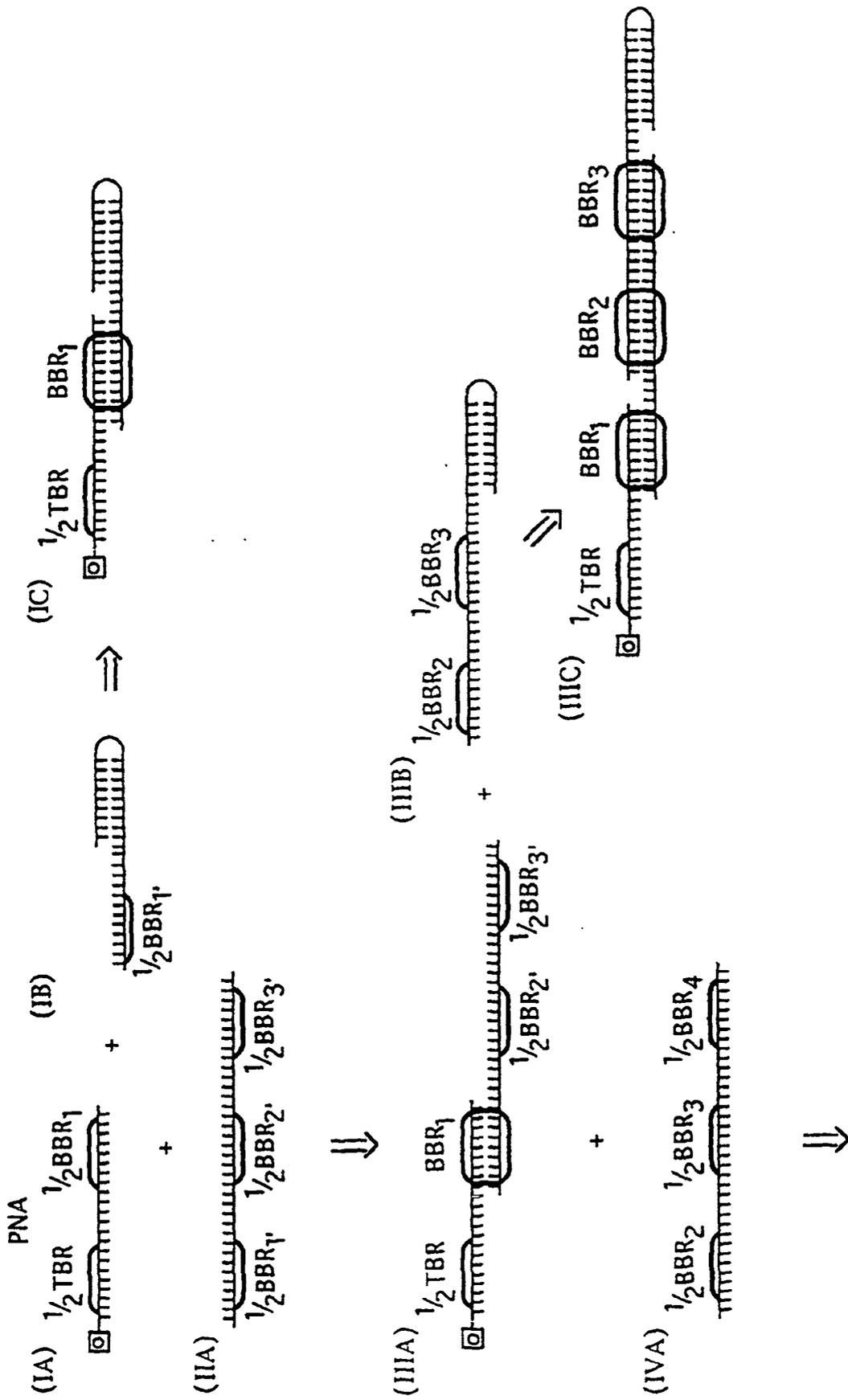


FIGURA 2C

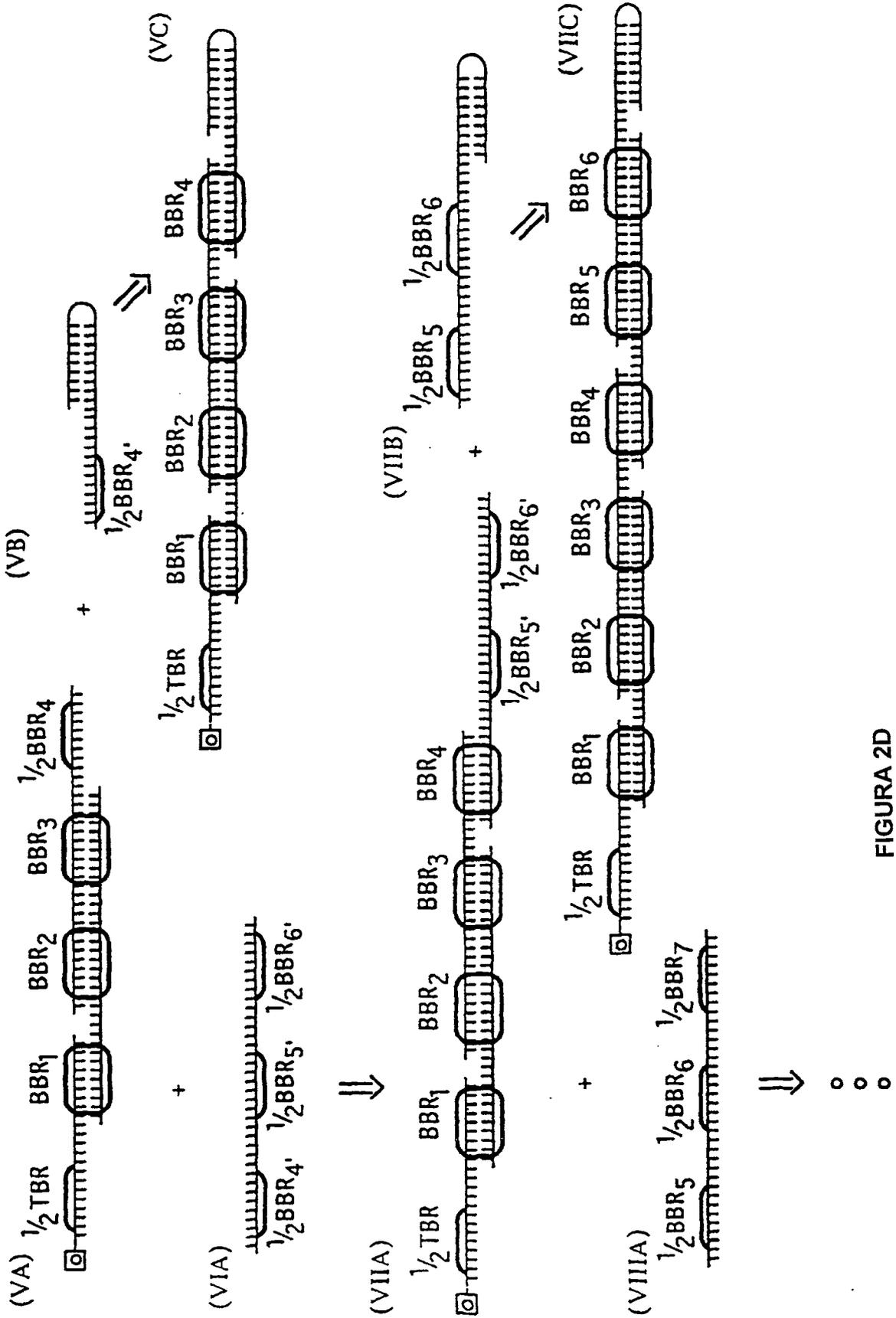


FIGURA 2D

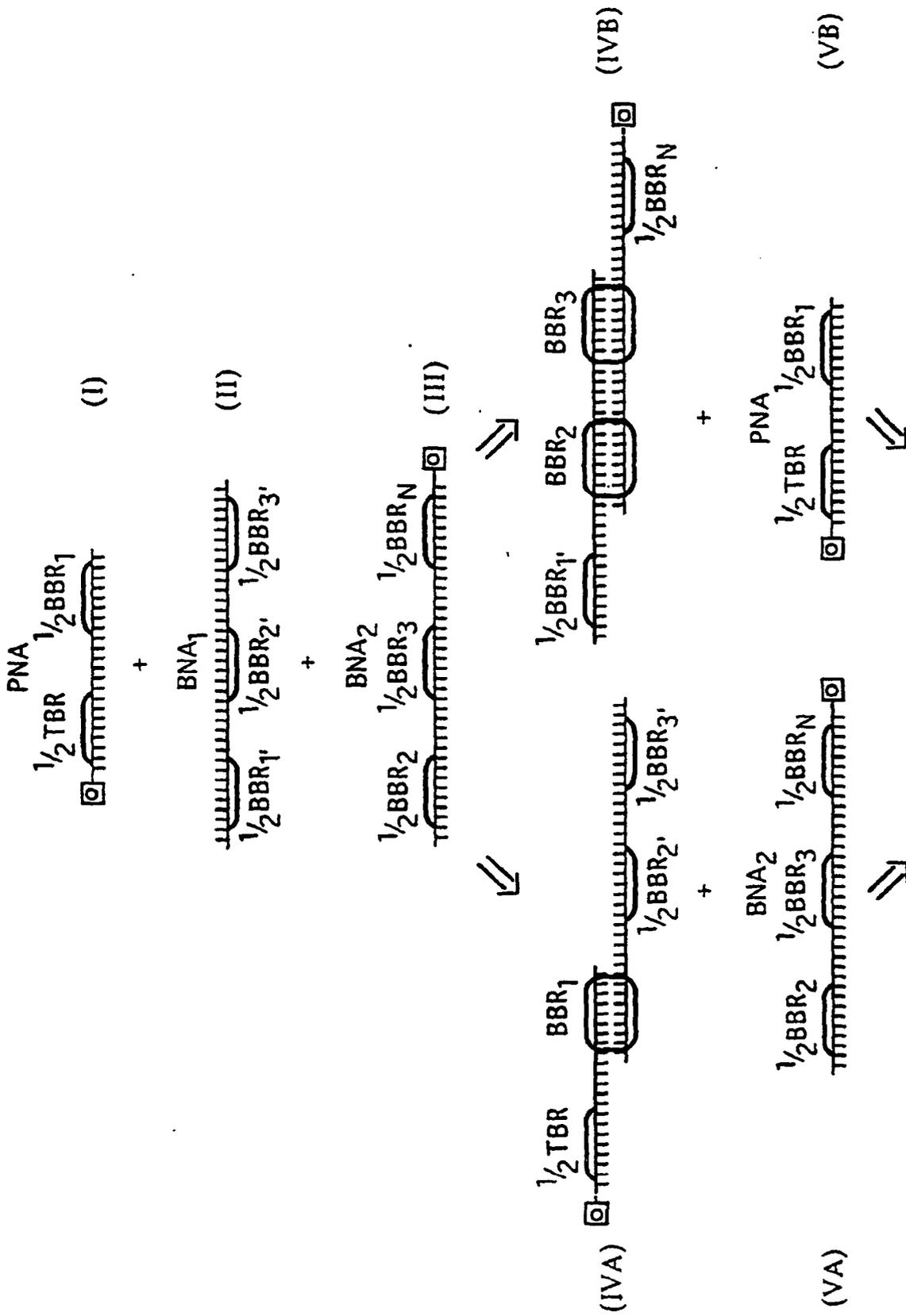


FIGURA 3A

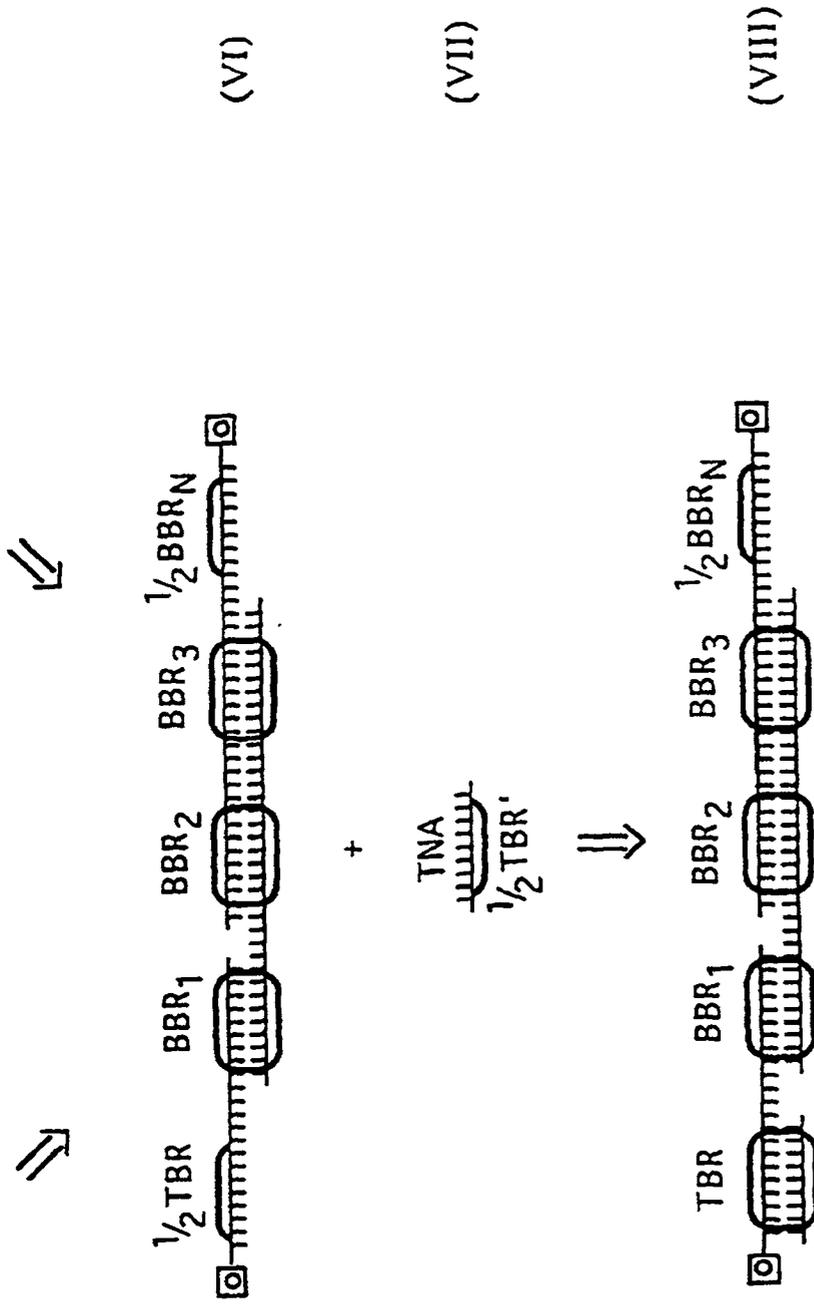


FIGURA 3B

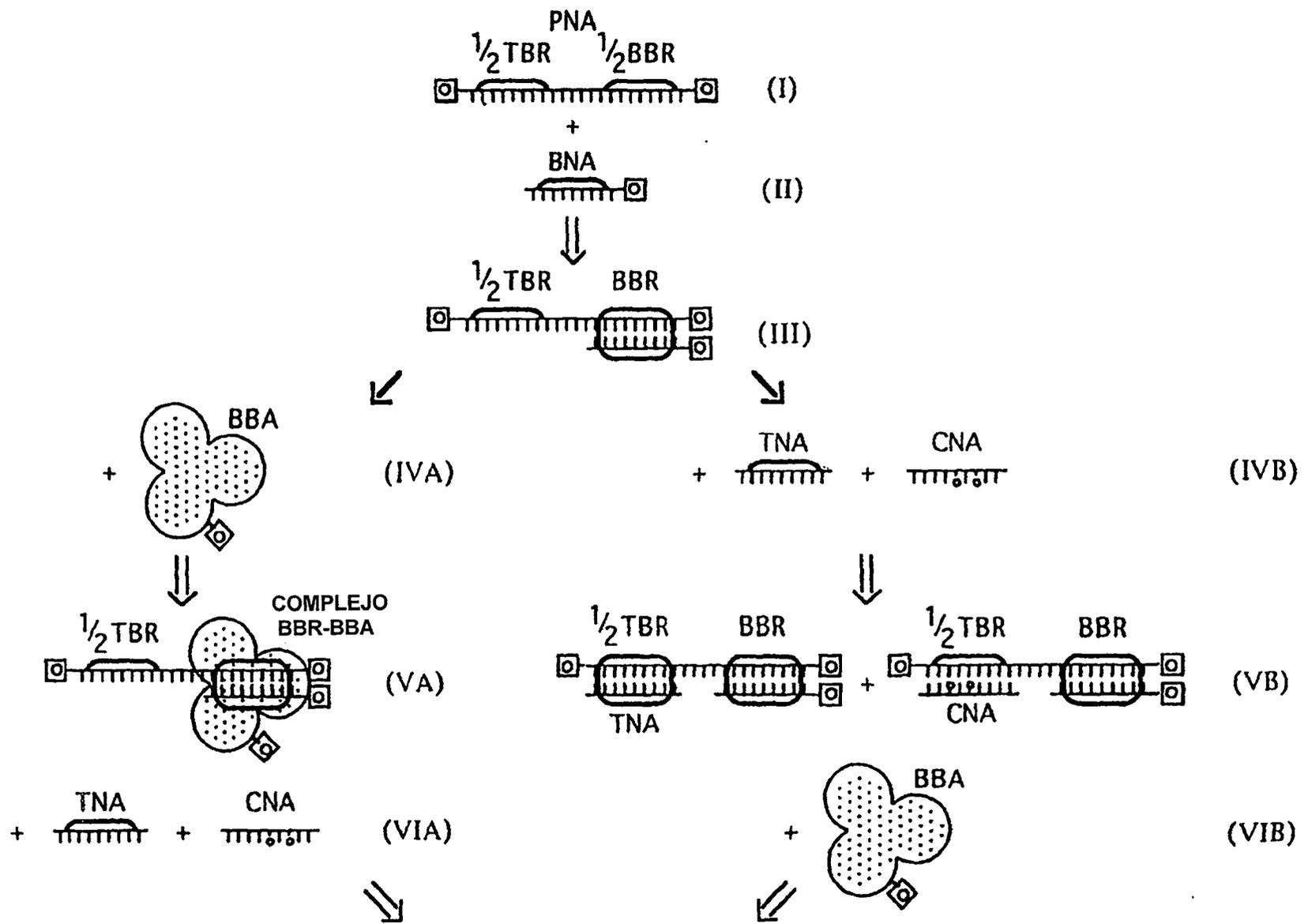


FIGURA 4A

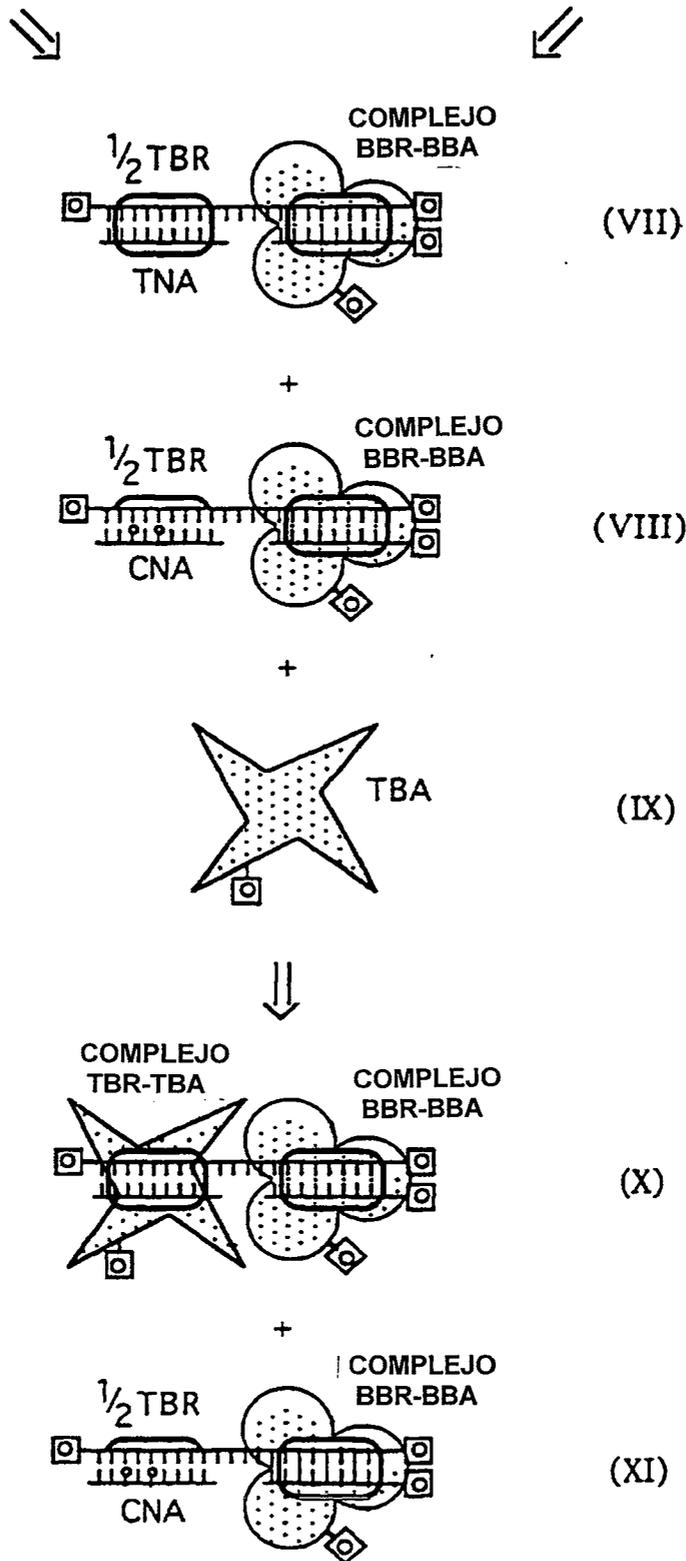


FIGURA 4B

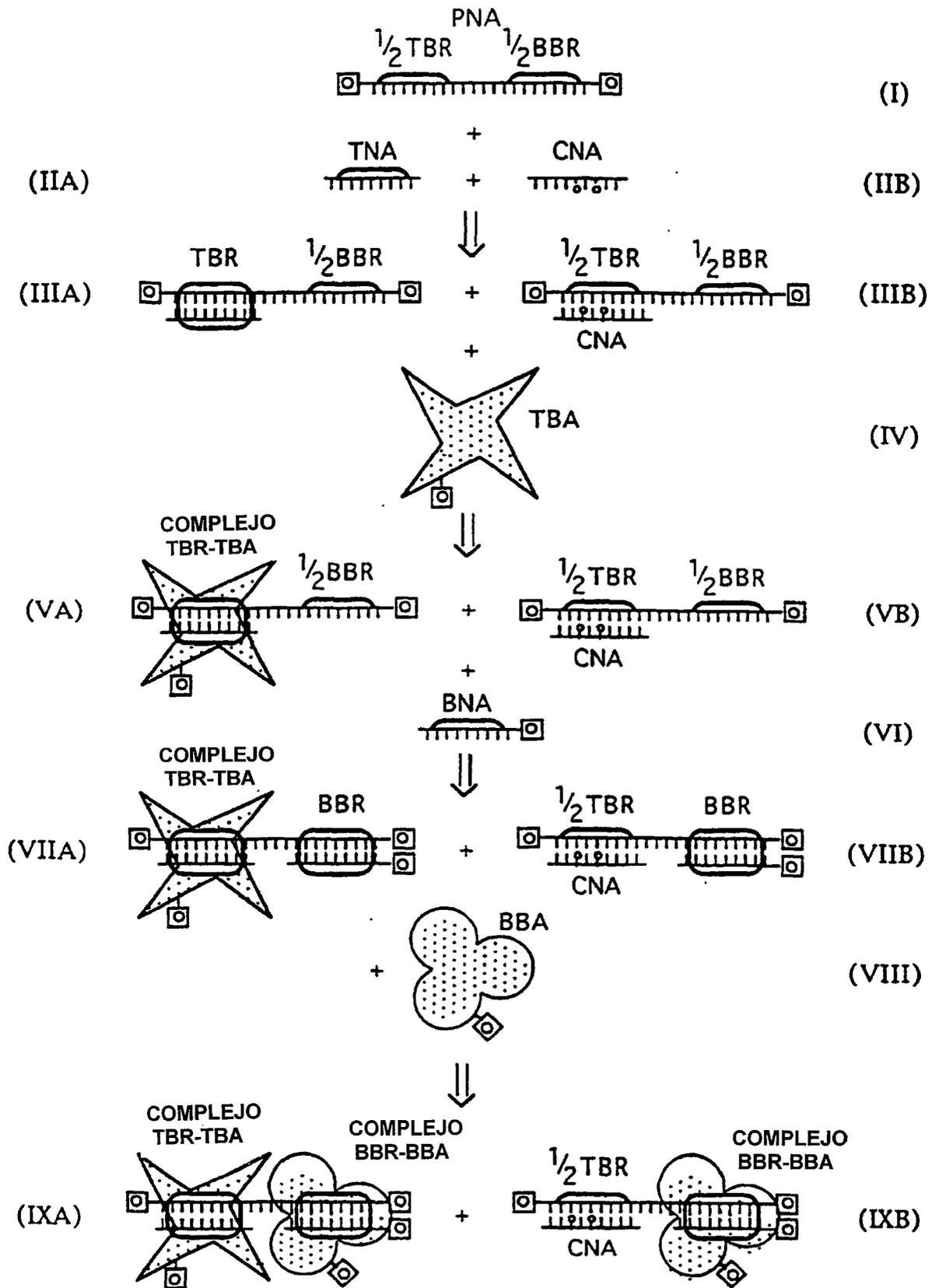


FIGURA 4C

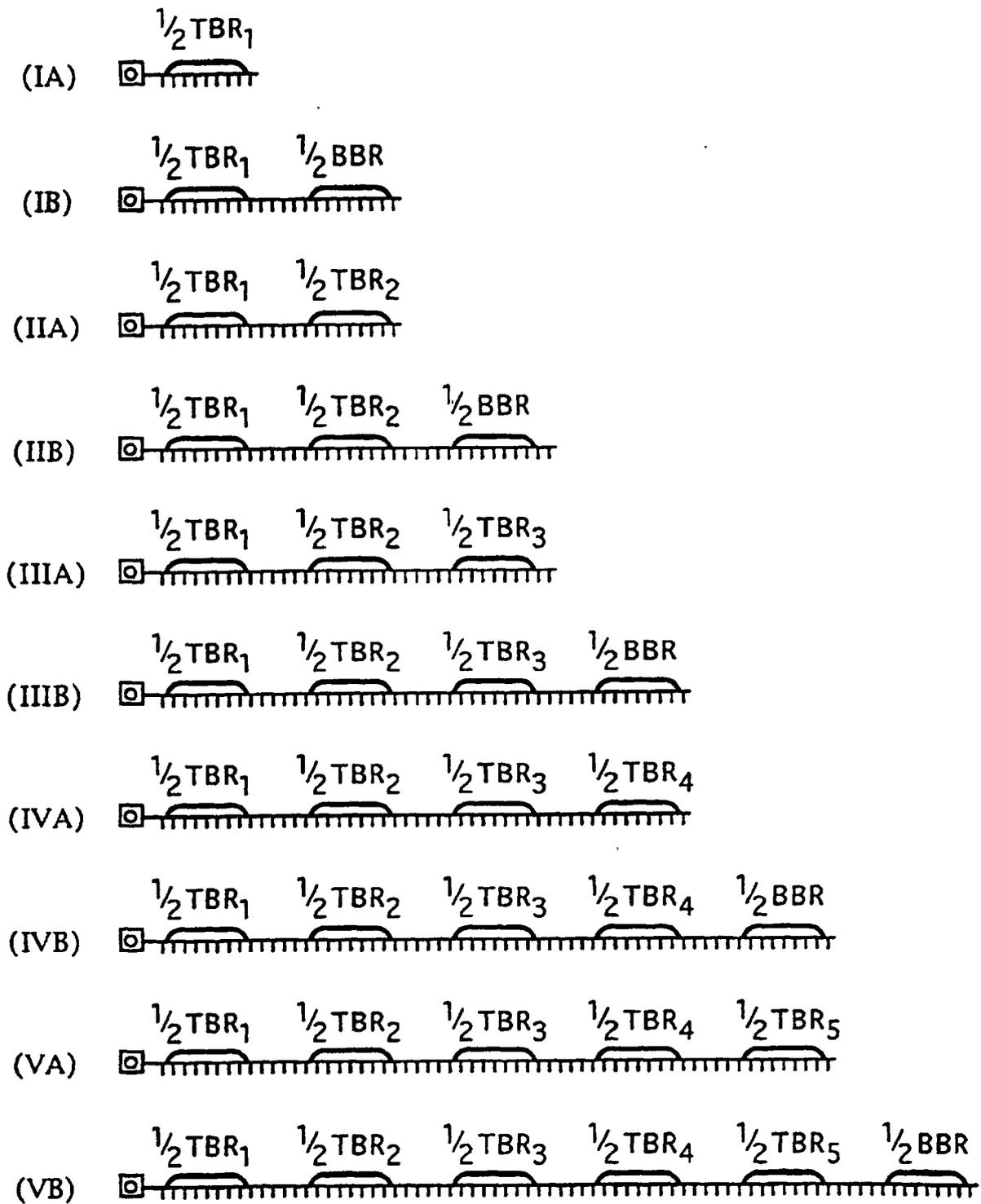
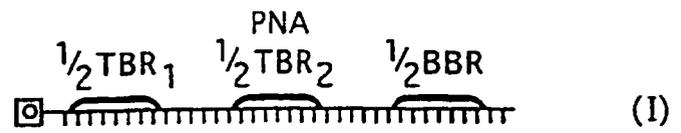


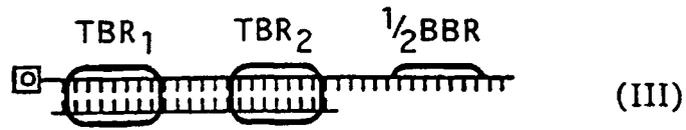
FIGURA 5



+



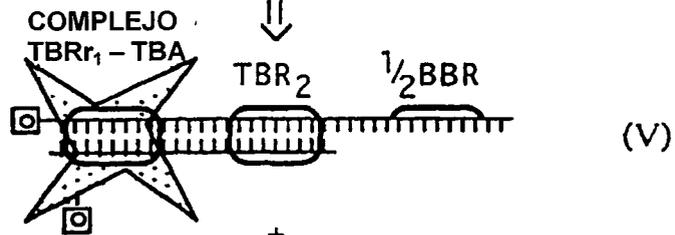
⇓



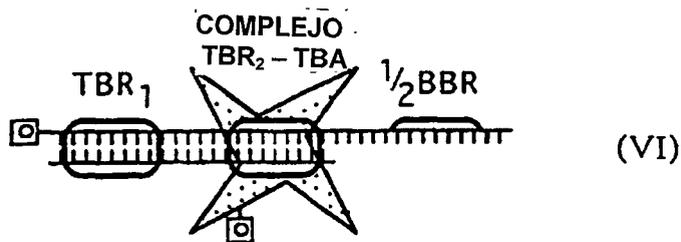
+



⇓



+



+

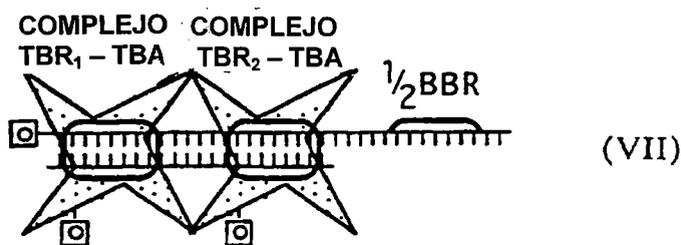
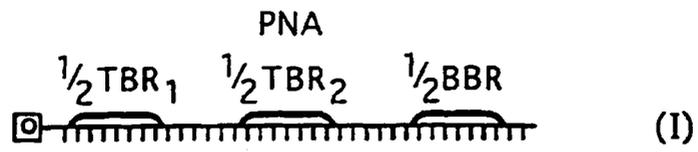
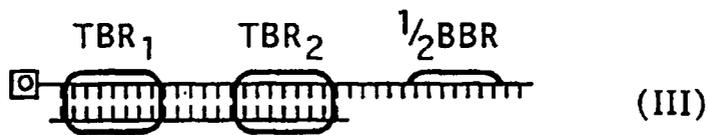


FIGURA 6A



+



+

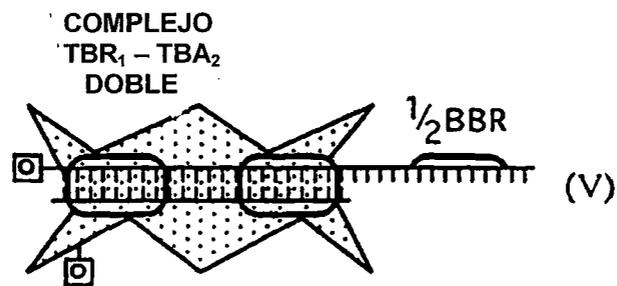
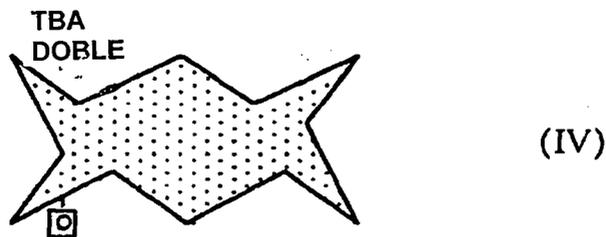


FIGURA 6B

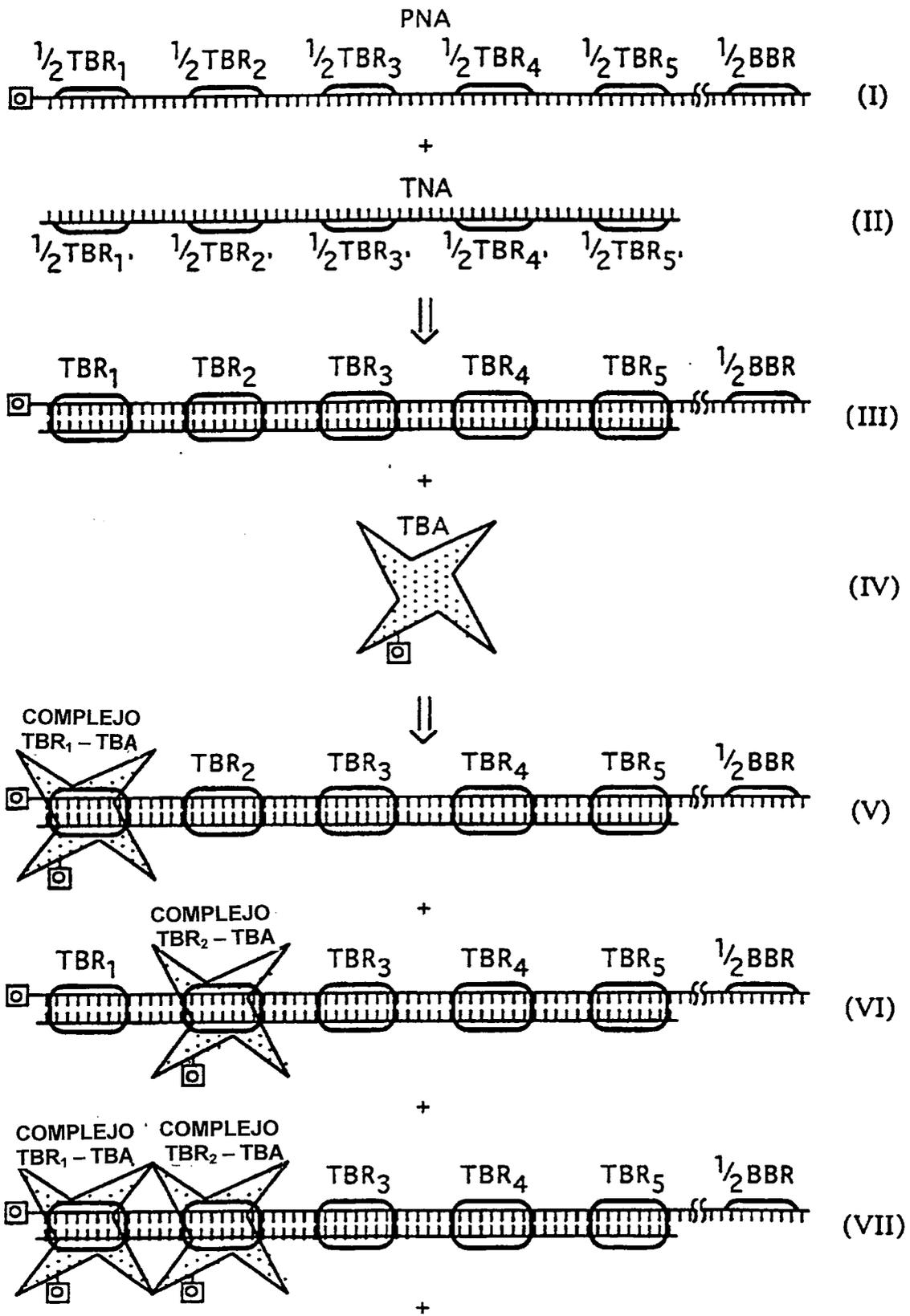


FIGURA 6C

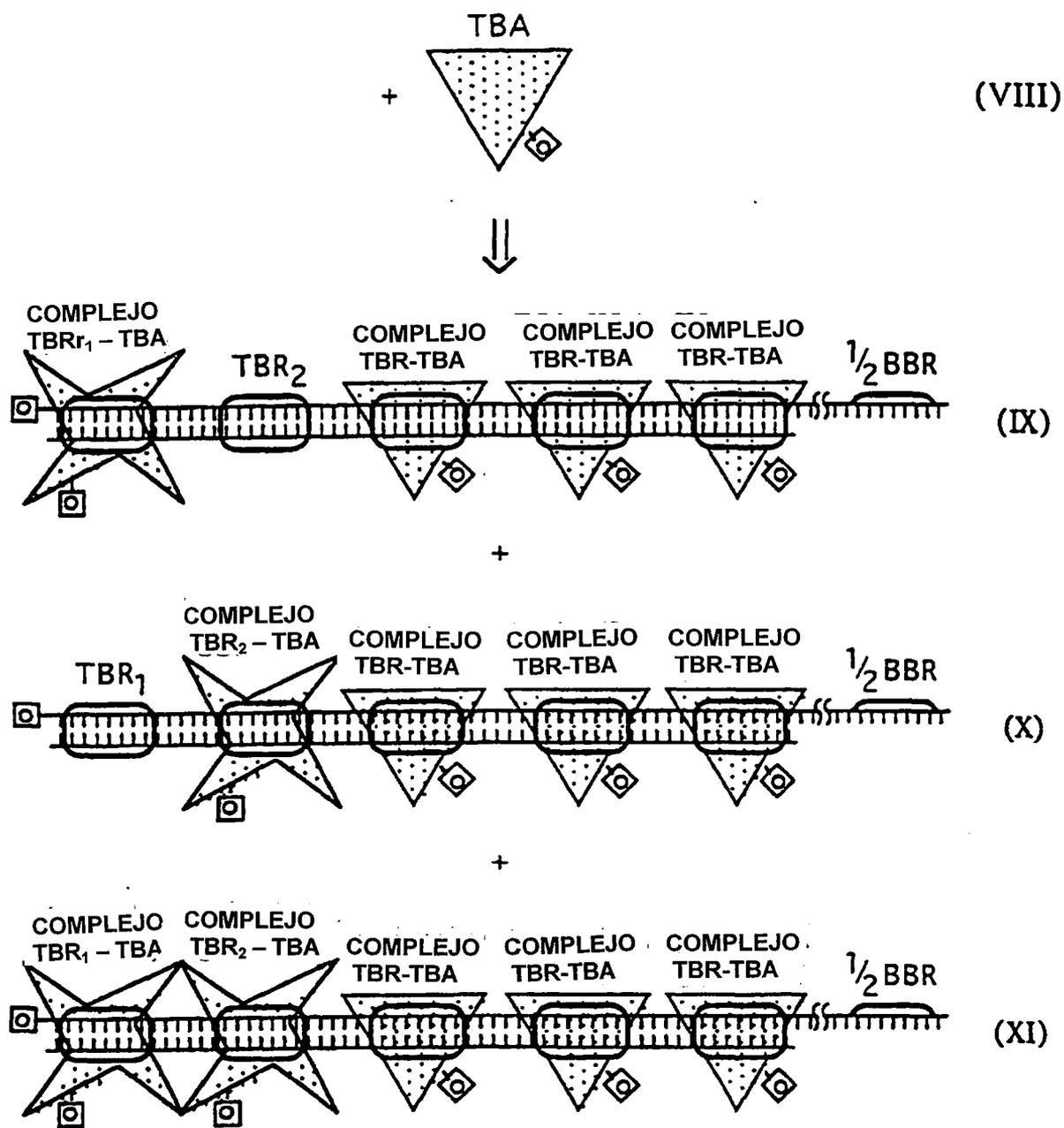


FIGURA 6D

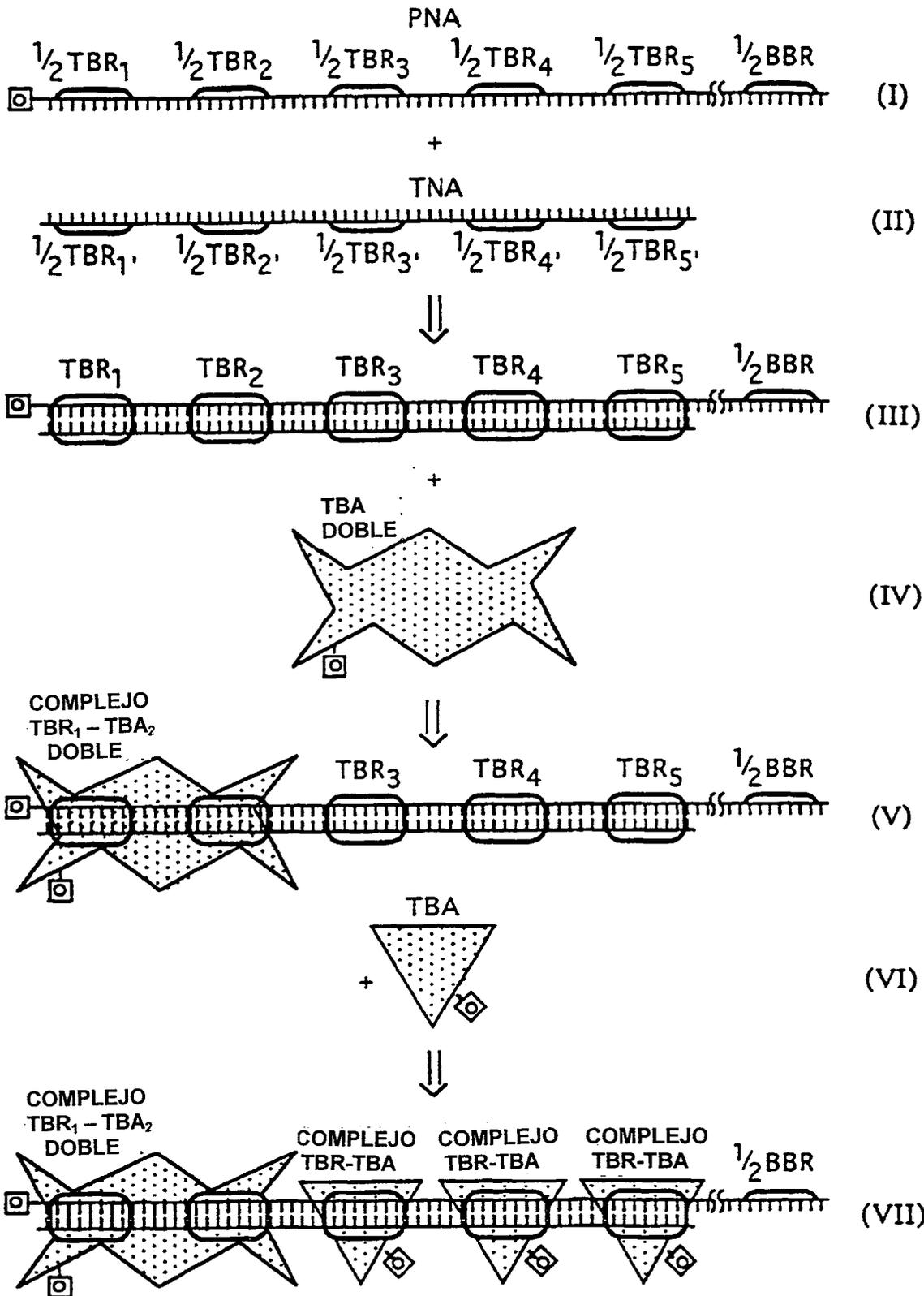


FIGURA 6E

SEC. ID.: 37

12345678901234567890123456789012345678901234567890  
CTACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGAGGCGTGGCCTGGGCGGGACTGGGGAGTGGCGTCCC  
+++++  
NF-kB NF-kB SP1 SP1 SP1

Kit de ensayo PNA1 para VIH (+++ del anterior), SEC. ID.: 38:

\*\*\*CTACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGAGG\*\*\*

HIV Test Kit PNA2 (=== from above), SEQ. ID:39:

###CGGGACTGGGGAGTGGCGTCCC###

La secuencia del extremo adhesivo en PNA2 es complementaria de uno de los extremos del operador ADN formado a partir de:

###OL1-OL2-OL3  
OL1'-OL2'-OL3'\*\*\*

o

###OR3-OR2-OR1  
OR3'-OR2'-OR1'\*\*\*

FIGURA 7

MUESTRA DE ÁCIDO NUCLEICO  
BICATENARIO FRAGMENTADO

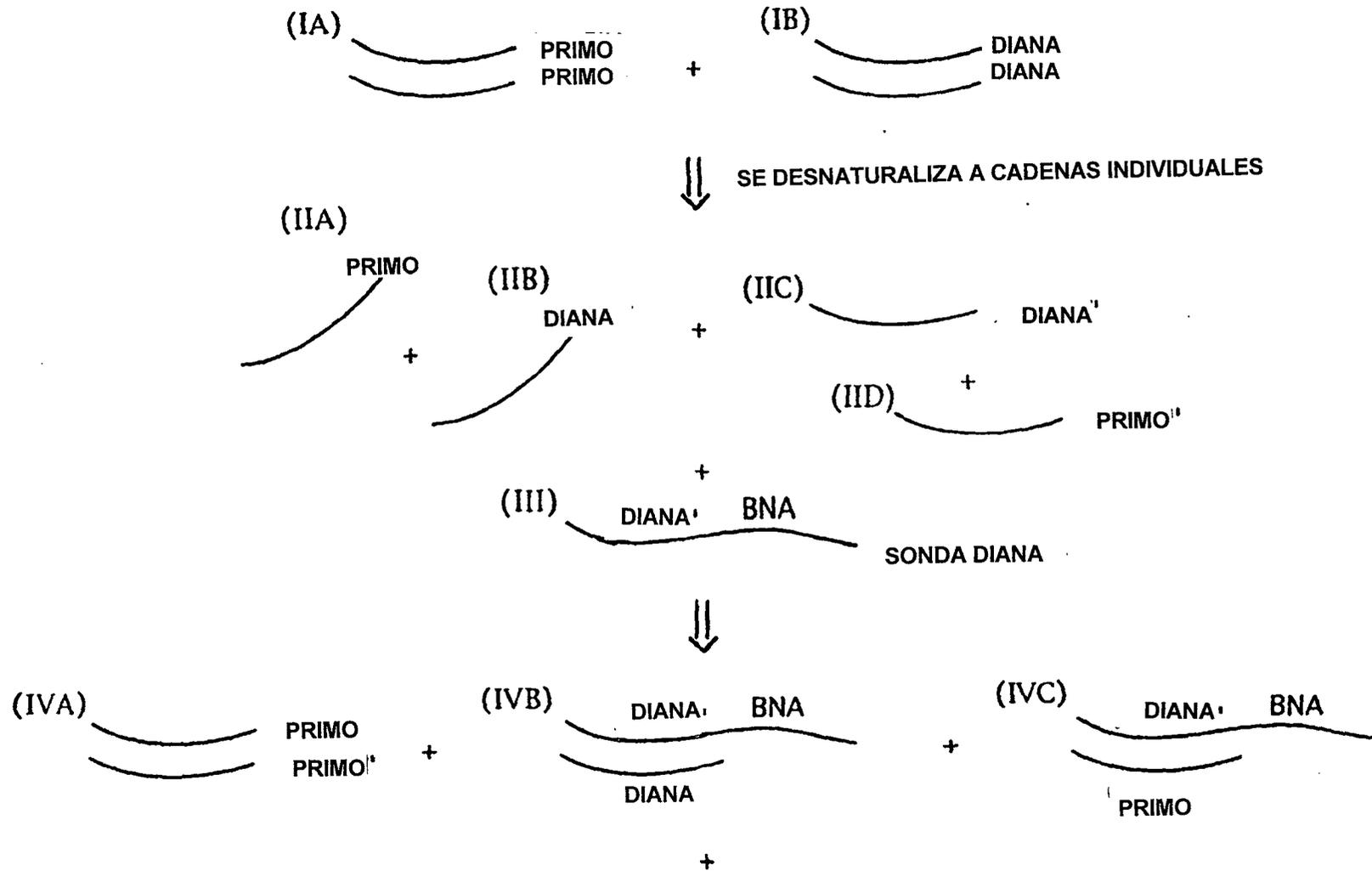


FIGURA 8A

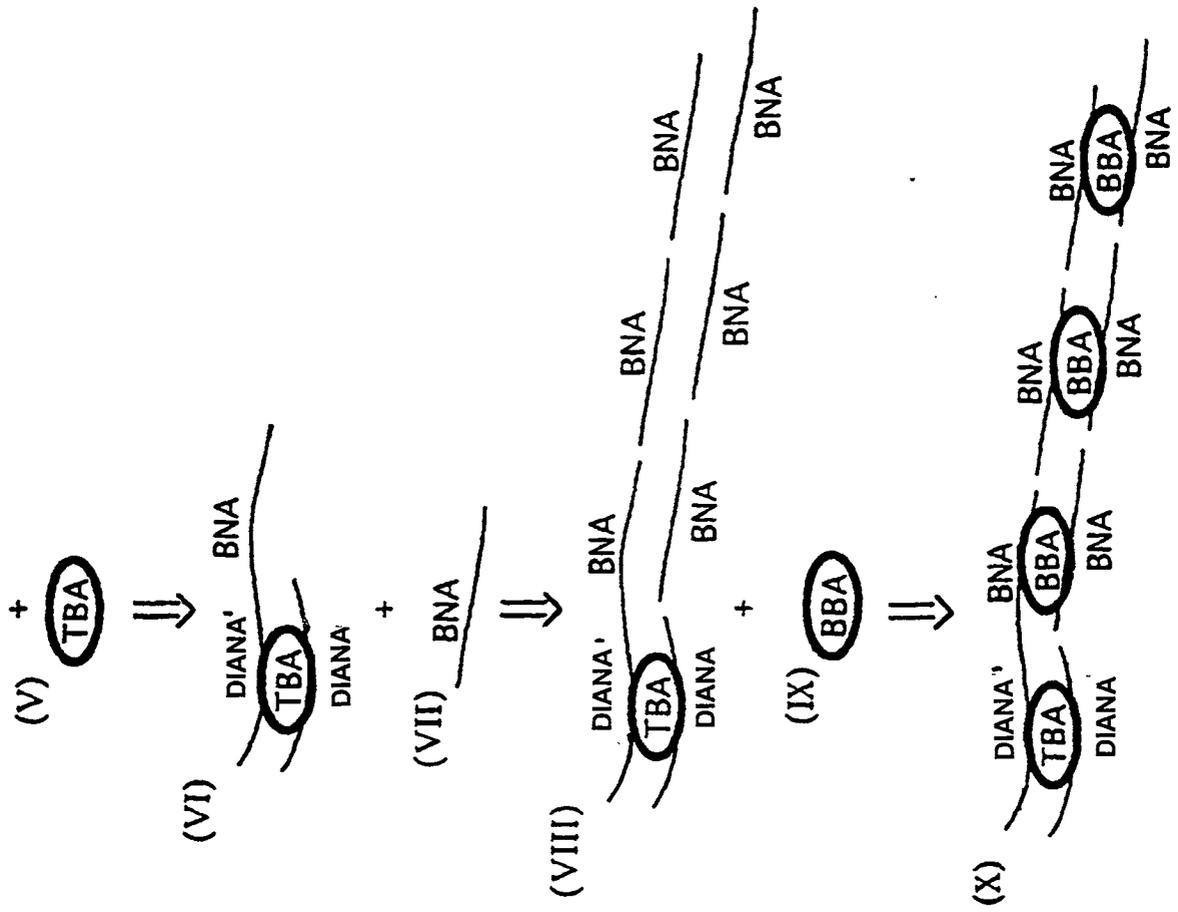


FIGURA 8B

TBA: MONTAJE DE UNIÓN A LA DIANA

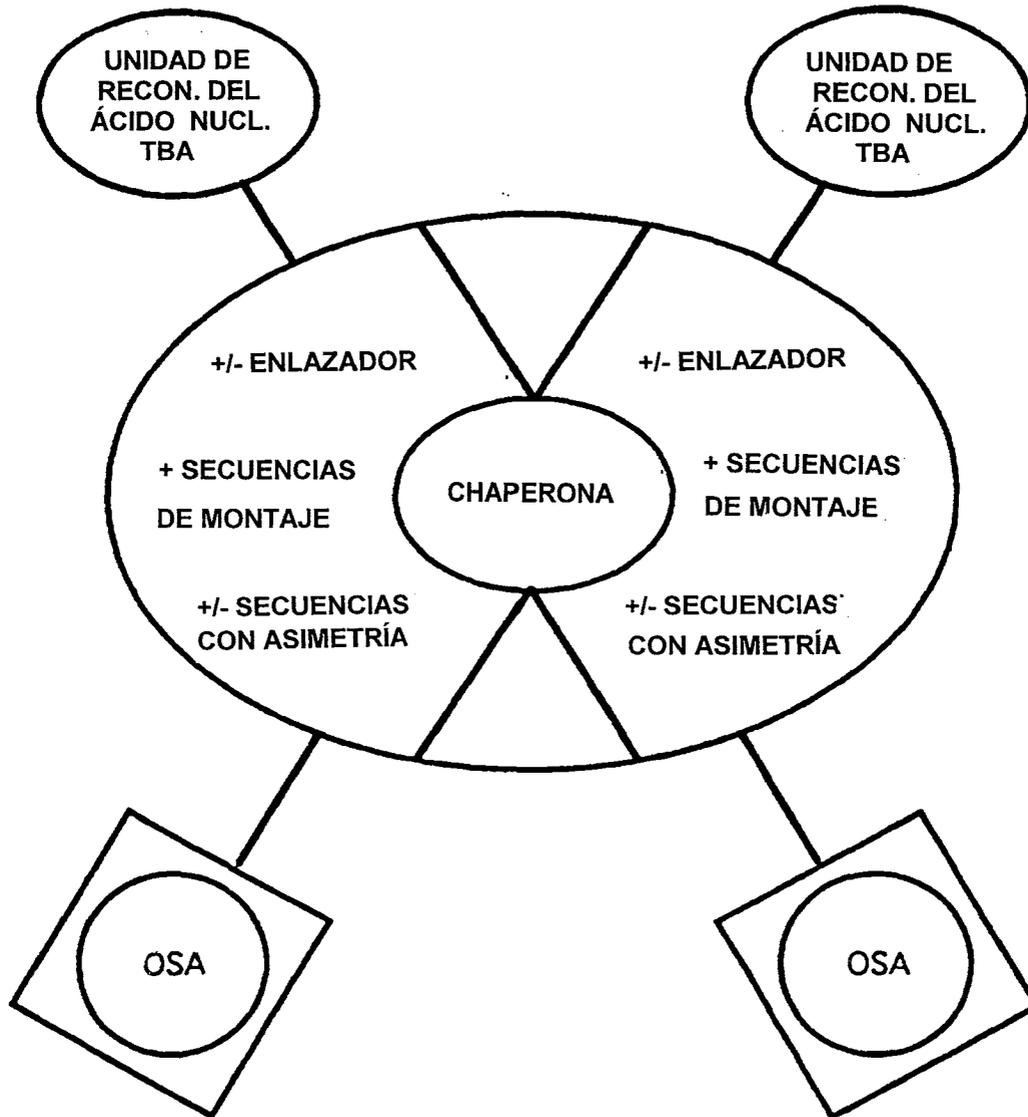
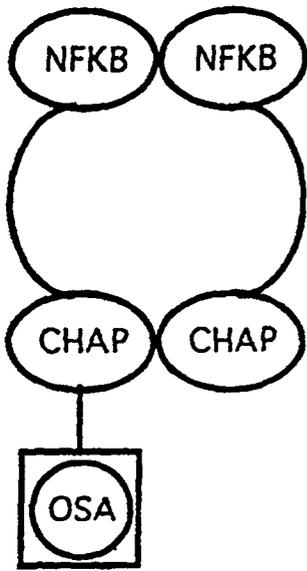
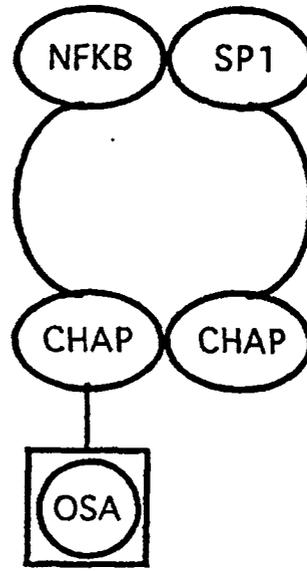


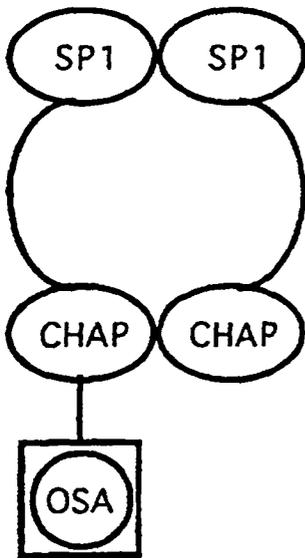
FIGURA 9



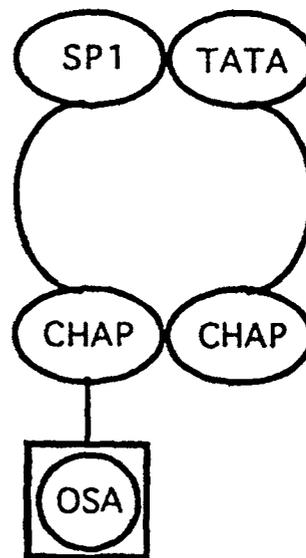
HIV-DETECT I



HIV-DETECT II

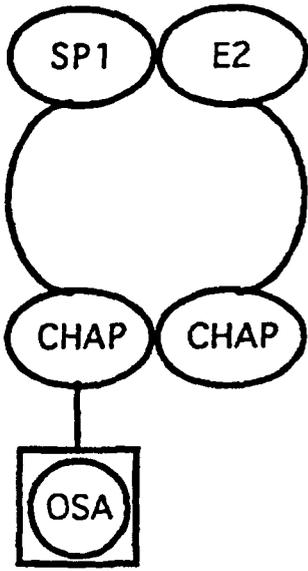


HIV-DETECT III

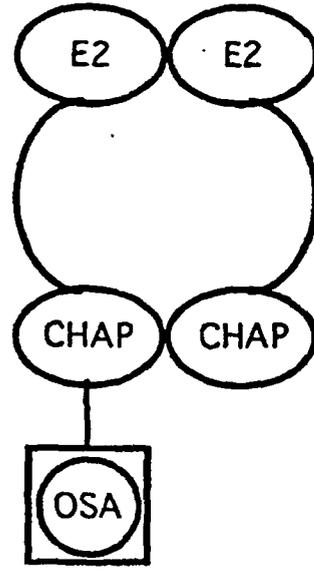


HIV-DETECT IV

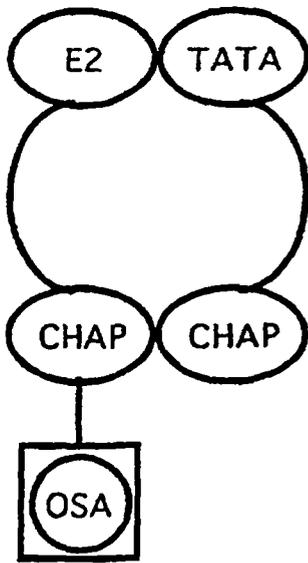
FIGURA 10



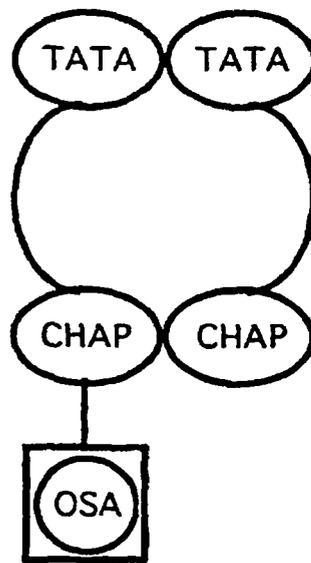
HPV-DETECT I



HPV-DETECT II



HPV-DETECT III



HPV-DETECT IV

FIGURA 11

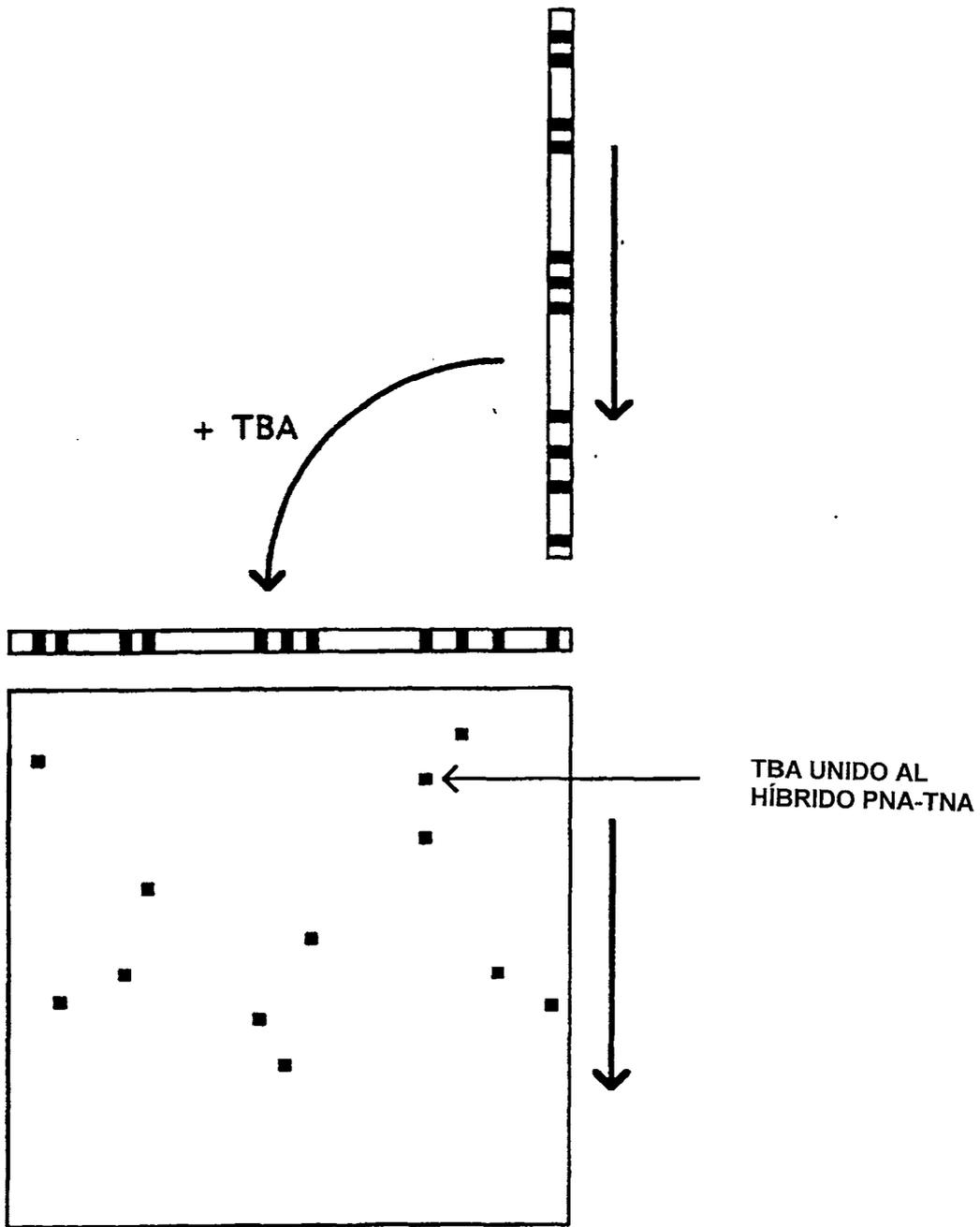


FIGURA 12A

HÍBRIDO PNA-TNA  
Y OTRO ADN DE LA MUESTRA

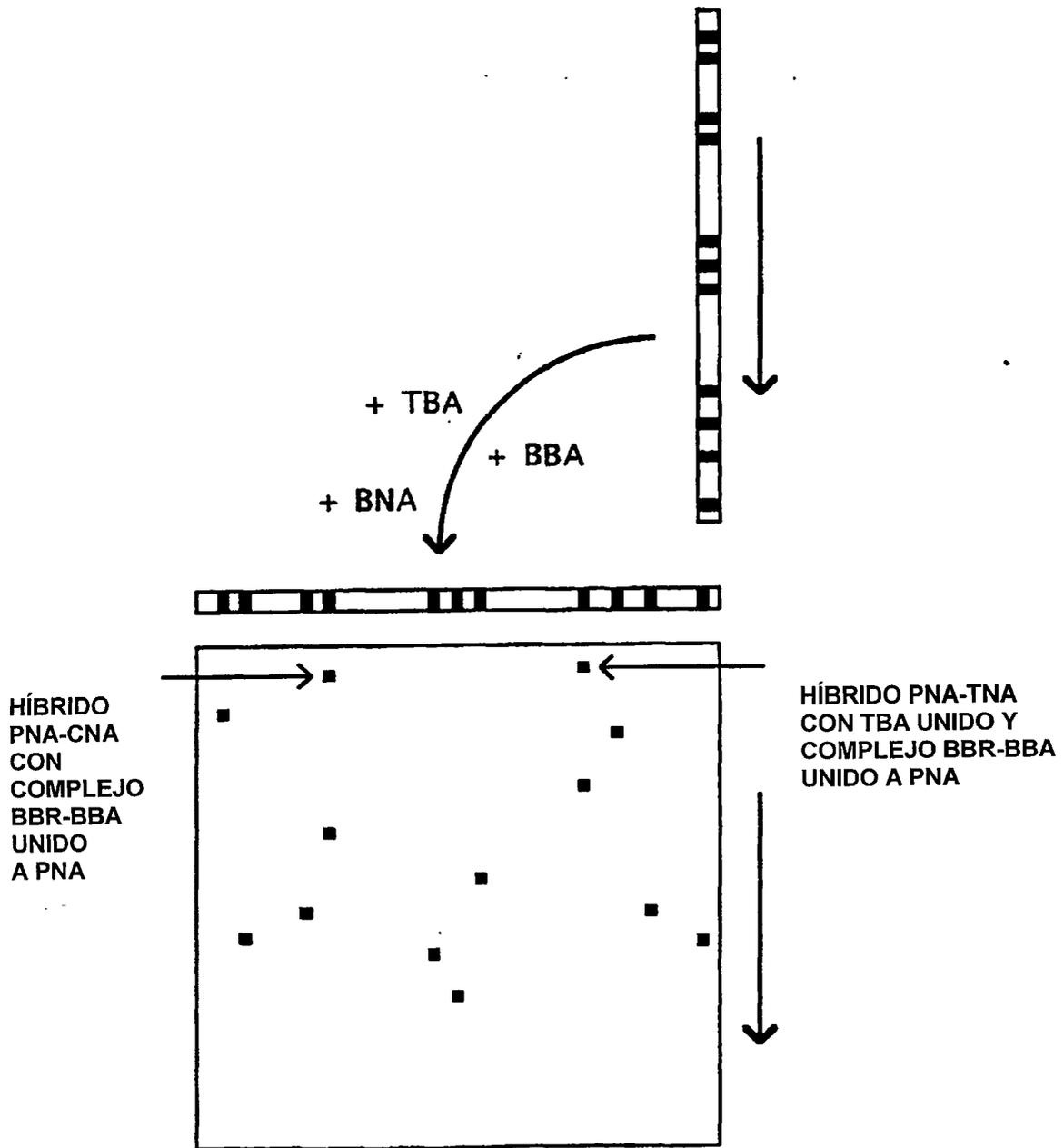


FIGURA 12B

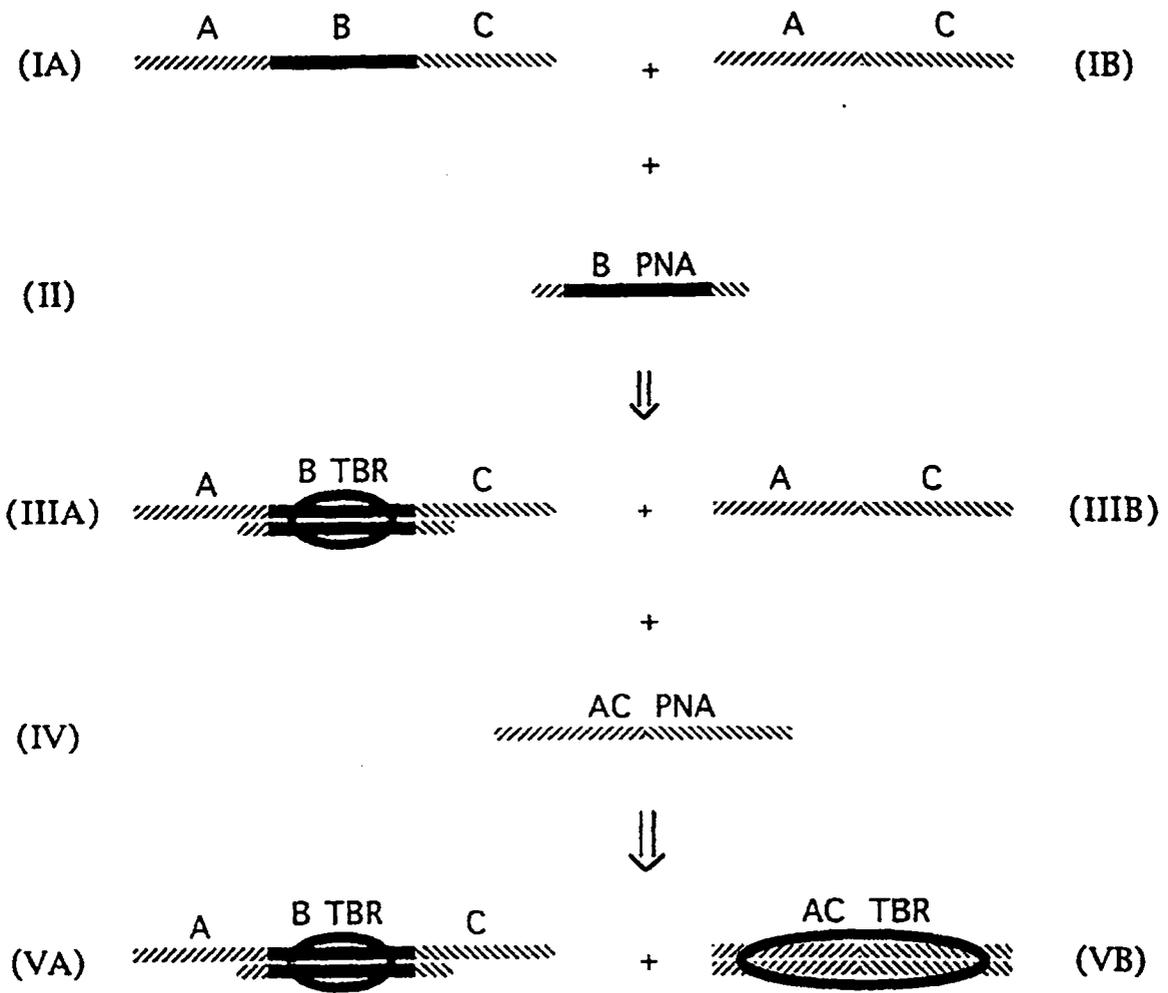


FIGURA 13

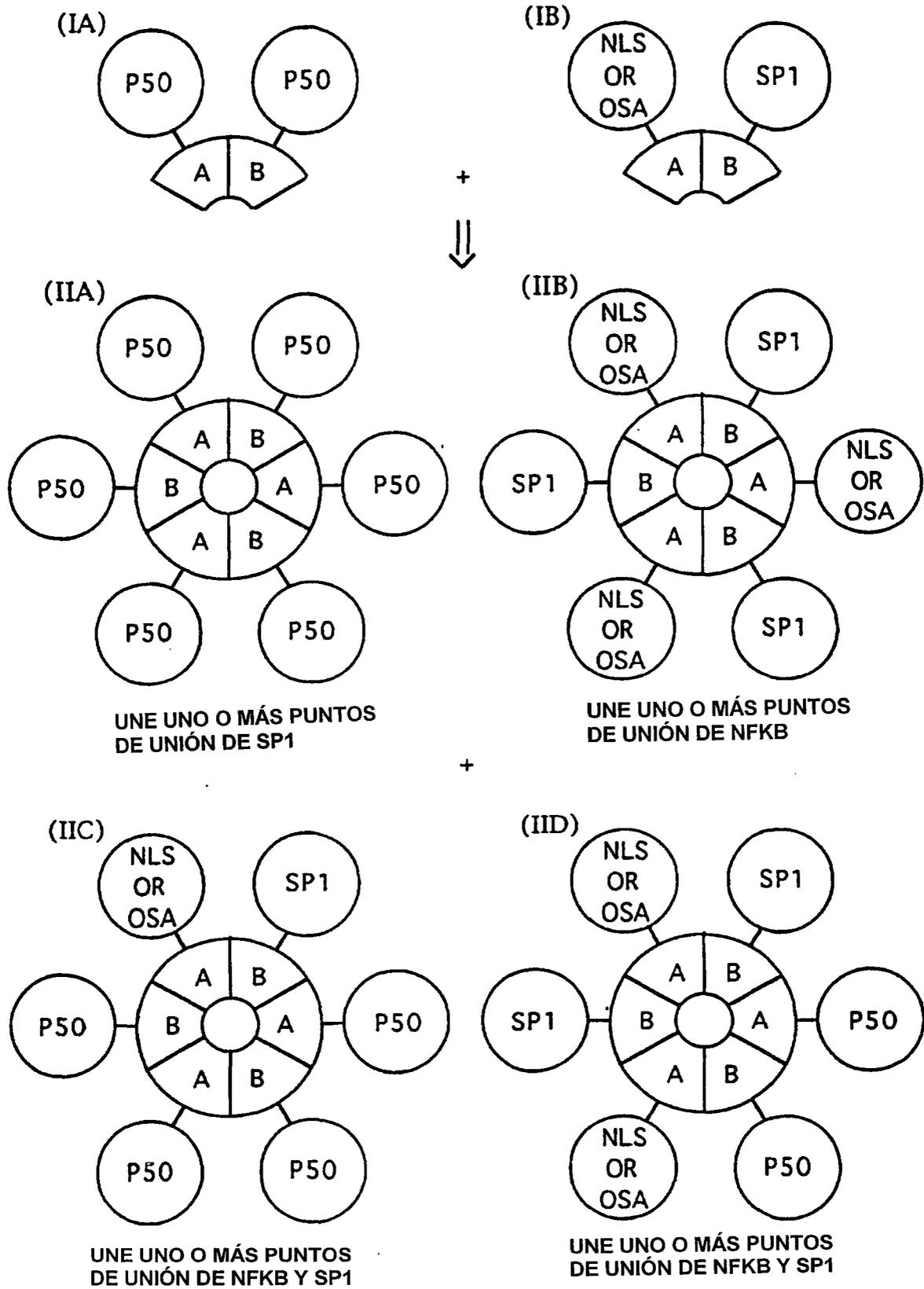


FIGURA 14

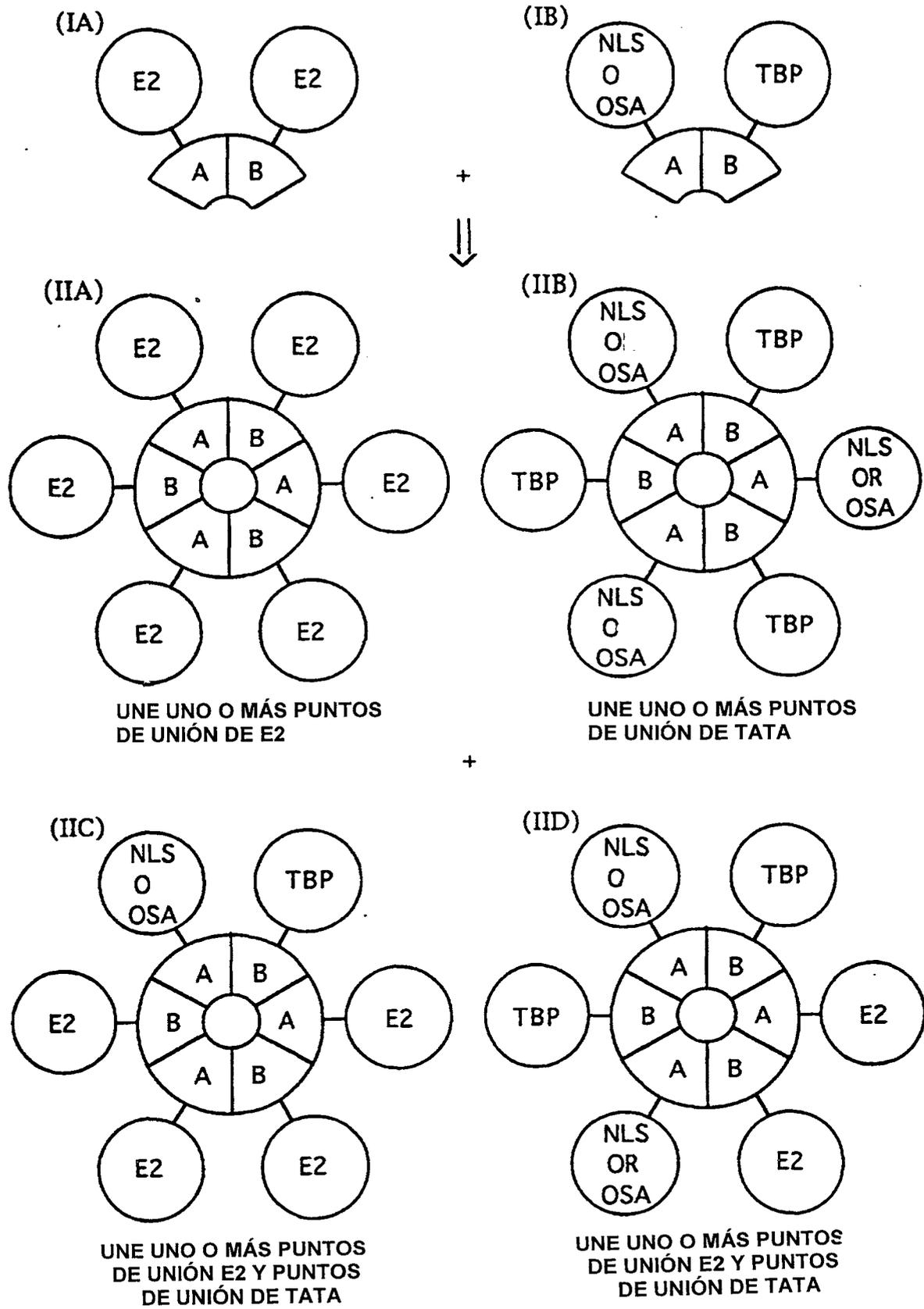


FIGURA 15

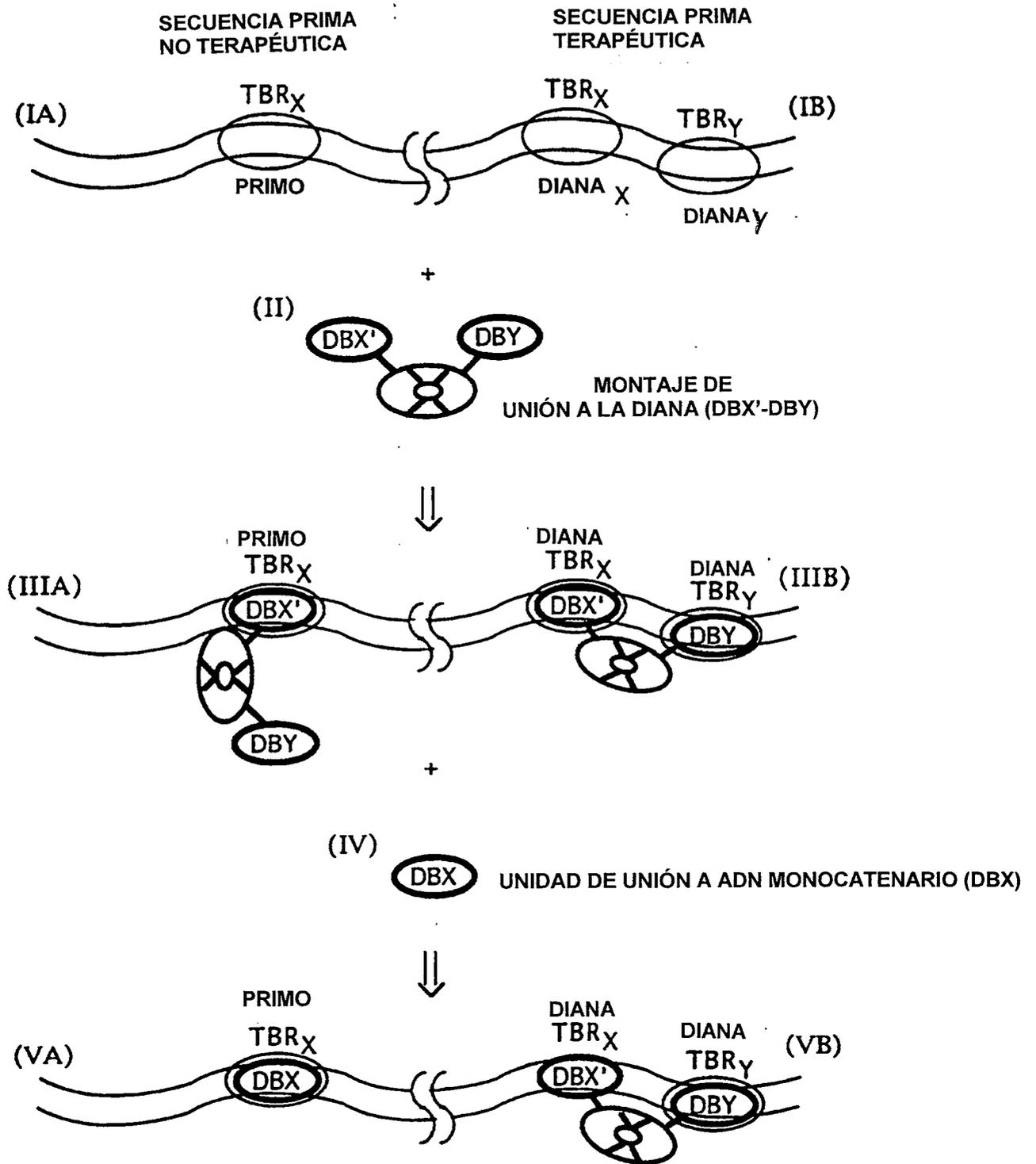


FIGURA 16

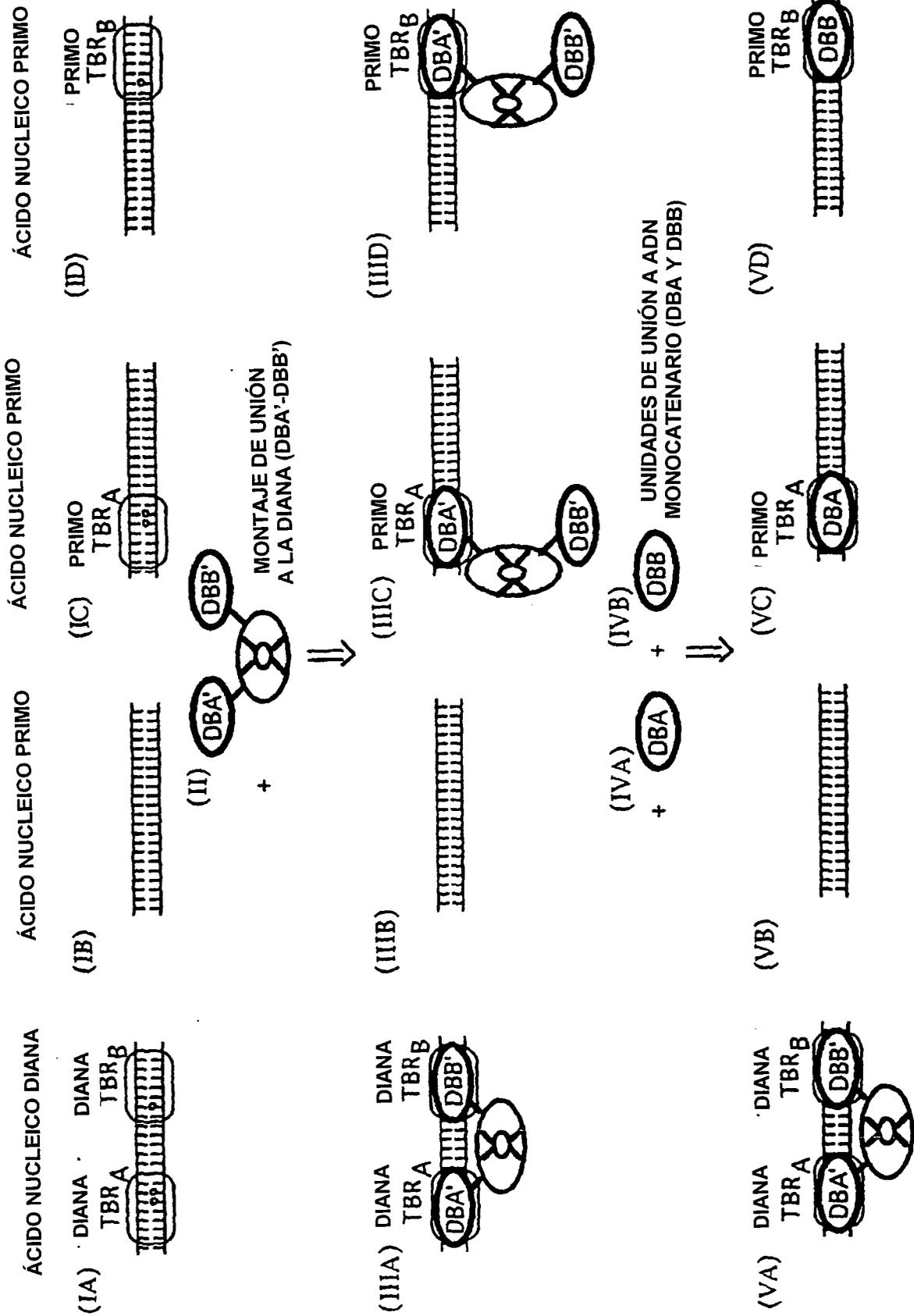


FIGURA 17