



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 235**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09000032 .4**

96 Fecha de presentación : **05.06.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **2080813**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.07.2009**

54 Título: **Ligandos de ácido nucleico que se unen a ADN polimerasas y las inhiben.**

30 Prioridad: **07.06.1995 US 484557**
07.06.1995 US 487720
07.06.1995 US 487426

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.05.2011

73 Titular/es: **GILEAD SCIENCES, Inc.**
333 Lakeside Drive
Foster City, California 94404, US

72 Inventor/es: **Gold, Larry y**
Jayasena, Sumedha

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

DESCRIPCIÓN

Ligandos de ácido nucleico que se unen a ADN polimerasas y las inhiben

5 **Campo de la invención**

[0001] En la presente invención se describen procedimientos para identificar y preparar ligandos de ácido nucleico con alta afinidad por las ADN polimerasas, específicamente para las ADN polimerasas termoestables. En una realización preferida, la ADN polimerasa se selecciona de entre la polimerasa Taq, una polimerasa termoestable aislada de *Thermus aquaticus*, o la polimerasa Tth, una ADN polimerasa y transcriptasa inversa termoestable aislada de *Thermus thermophilus*. El procedimiento utilizado en la presente invención para identificar tales ligandos de ácido nucleico se denomina SELEX, un acrónimo (en inglés) de Evolución Sistemática Ligandos mediante Enriquecimiento Exponencial. También se describen en la presente invención un procedimiento mejorado para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa usando los ligandos de ácido nucleico de esta invención. En la presente invención específicamente se describen ligandos de ácido nucleico de elevada afinidad por la polimerasa Taq y polimerasa Tth. La invención incluye ligandos de ADN de alta afinidad, los cuales se unen a la polimerasa Taq y polimerasa Tth, inhibiendo de ese modo su capacidad para polimerizar la síntesis del ADN a temperaturas ambiente. En esta invención se incluyen además interruptores de ácido nucleico. Los ligandos de ácido nucleico de esta invención, con unión dependiente de la temperatura a las ADN polimerasas, son ejemplo de ligandos cuyas propiedades deseables puede activarse y desactivarse en base a cualquier número de condiciones de reacción.

Antecedentes de la invención

[0002] La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica recientemente desarrollada que ha tenido un impacto significativo en muchas áreas de la ciencia. La PCR es un procedimiento rápido y sencillo para amplificar específicamente una secuencia diana de ADN de forma exponencial. (Saiki et al. (1985) Science 230:1350; Mullis y Faloona (1987) Methods Enzymol. 155:335). De forma resumida, el procedimiento consiste en sintetizar un grupo de cebadores que tienen secuencias nucleotídicas complementarias del ADN que flanquea la secuencia diana. Los cebadores se mezclan a continuación con una solución del ADN diana, una polimerasa de ADN termoestable, y los cuatro desoxinucleótidos (A, T, C y G). La solución se calienta entonces hasta una temperatura suficiente para separar las hebras de ADN complementarias (aproximadamente 95°C), y se enfría a continuación hasta una temperatura suficiente para permitir que los cebadores se unan a las secuencias flanqueantes. La mezcla de reacción se calienta entonces de nuevo (hasta aproximadamente 72°C) para permitir el progreso de la síntesis del ADN. Después de un breve período de tiempo, la temperatura de la reacción se incrementa de nuevo hasta una temperatura suficiente para separar el recién formado ADN de doble hebra, completándose de este modo el primer ciclo de la PCR. La mezcla de reacción se enfría entonces y se repite el ciclo. Por tanto, la PCR consiste en ciclos repetitivos de fusión, hibridación y síntesis del ADN. Veinte ciclos de replicación pueden rendir una amplificación de hasta un millón de veces de la secuencia diana de ADN. La capacidad para amplificar una única molécula de ADN mediante la PCR tiene aplicaciones en la microbiología ambiental y alimentaria (Wernars et al. (1991) Appl. Env. Microbiol. 57:1914-1919; Hill y Keasler (1991) Int. J. Food Microbiol. 12:67-75), en la microbiología clínica (Wages et al. (1991) J. Med. Virol. 33:58-63; Sacramento et al. (1991) Mol. Cell Probes 5:229-240; Laure et al. (1988) Lancet 2:538), en la oncología (Kumar y Barbacid (1988) Oncogene 3:647-651; McCormick (1989) Cancer Cells 1:56-61; Crescenzi et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4869), en la prognosis de enfermedades genéticas (Handyside et al. (1990) Nature 344:768-770), en los bancos de sangre (Jackson (1990) Transfusion 30:51-57) y en las ciencias forenses (Higuchi et al. (1988) Nature (London) 332:543).

[0003] La disponibilidad de ADN polimerasas termoestables, tales como la polimerasa de ADN Taq, ha simplificado y mejorado la PCR. Originalmente, sólo estaban disponibles polimerasas sensibles al calor, tales como la ADN polimerasa de *E. coli*, para su uso en la PCR. Sin embargo, las polimerasas sensibles al calor se destruyen a las temperaturas necesarias para fundir el ADN de doble hebra, y debe añadirse polimerasa adicional después de cada ciclo de la PCR. La polimerasa de ADN Taq, aislada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, es estable hasta los 95°C, y su uso en la PCR ha eliminado la necesidad de añadir de forma repetitiva de polimerasas sensibles a la temperatura después de cada ciclo térmico. Adicionalmente, puesto que la polimerasa Taq puede usarse a temperaturas más elevadas, ha mejorado la especificidad y sensibilidad de la PCR. La razón de la especificidad mejorada y que a temperaturas más elevadas, la unión de los promotores a sitios distintos de los deseados (fenómeno denominado "mispriming") está significativamente reducida.

[0004] Desde su descubrimiento, la Reacción en Cadena de la Polimerasa ha sido modificada para varias aplicaciones, tales como la PCR in situ, en la cual el límite de detección de la hibridación in situ tradicional se ha llevado hasta el nivel de la copia única (Haase et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4971-4975), y la PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), en donde una secuencia de ARN se convierte en su copia de ADN (ADNc) mediante la transcriptasa inversa (RT) antes de ser amplificada por la PCR, convirtiendo el ARN en un sustrato para la PCR

(Kawasaki (1991) "Amplification of RNA in PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications," editores Innis et al., Academic Press Inc., San Diego, CA, 21-27). Sin embargo, las transcriptasas inversas víricas mesófilas a menudo son incapaces de sintetizar moléculas de ADNc de longitud completa, porque no pueden "leer a lo largo" de las estructuras secundarias estables de las moléculas de ARN. Esta limitación se ha superado recientemente mediante el uso de una polimerasa aislada de *Thermus thermophilus* (polimerasa Tth). La polimerasa Tth es una polimerasa termoestable que puede funcionar como transcriptasa inversa y como ADN polimerasa (Myers y Gelfand (1991) *Biochemistry* 30:7662-7666). La transcripción inversa realizada a una temperatura elevada usando la polimerasa Tth elimina las estructuras secundarias del ARN plantilla, haciendo posible la síntesis de ADNc de longitud completa.

[0005] Aunque se ha hecho un progreso significativo en la tecnología de la PCR, la amplificación de oligonucleótidos que no son diana debida a reacciones secundarias, tales como el cebado incorrecto del ADN de fondo y/o la oligomerización del cebador, todavía presenta un problema significativo. Esto es especialmente cierto en las aplicaciones de diagnóstico en las cuales la PCR se lleva a cabo en un medio que contiene ADN de fondo, mientras que el ADN puede estar presente en una única copia (Chou et al. (1992) *Nucleic Acid Res.* 20:1717-1723). Se ha determinado que estas reacciones secundarias a menudo ocurren cuando todos los reactivos se han mezclado a temperatura ambiente antes de iniciarse el ciclado térmico.

[0006] Se han descrito dos procedimientos que minimizan estas reacciones secundarias. En el primer procedimiento, denominado PCR "de arranque en caliente (hot start)" (Chou et al. (1992) *Nucleic Acid Res.* 20:1717-1723; D'Aquila et al. (1991) *Nucleic Acid Res.* 19:3749), todos los reactivos se calientan a 72°C antes de añadir el reactivo final, usualmente la polimerasa. En la PCR "de arranque en caliente" mediada por cera, un componente o componentes cruciales para la actividad de la polimerasa se separa físicamente, a baja temperatura, del resto de la mezcla de reacción mediante una capa de cera que se funde a partir del calentamiento en el primer ciclo (Chou et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:1717; Horton et al. (1994) *BioTechniques* 16:42). La PCR "de arranque en caliente" tiene ciertas desventajas; la obligatoriedad de reabrir los tubos antes de iniciar el termociclado incrementa la contaminación entrecruzada y el pipeteado repetido la hace tediosa a la hora de manipular un número elevado de muestras. Un reactivo que pueda colocarse directamente en la mezcla de reacción, junto con el resto de los componentes de reacción, e inhiba la polimerasa a temperatura ambiente será útil para superar las limitaciones asociadas con la PCR "de arranque rápido". Aunque este procedimiento incrementa la especificidad, reduciendo de ese modo los productos secundarios, el procedimiento es inconveniente para tratar un número elevado de muestras, la mezcla de reacción puede contaminarse más fácilmente, y el procedimiento es propenso a errores.

[0007] En el segundo procedimiento, se añade al mezcla de reacción completa un anticuerpo neutralizante contra la polimerasa Taq (denominado como Taqstart). Este anticuerpo inhibe la actividad polimerasa a temperatura ambiente (Kellogg et al. (1994) *BioTechniques* 16:1134-1137), pero se inactiva mediante desnaturalización por calor una vez la reacción se ha termociclado, haciendo activa la polimerasa. El inconveniente de esta estrategia para reducir los productos secundarios es que el anticuerpo anti-Taq debe almacenarse a -20°C hasta su uso, lo que significa que los equipos de detección deben empaquetarse y enviarse en condiciones controladas, lo que incrementa su coste. Además, para una única PCR se necesita una cantidad significativa de anticuerpo (~ 1 µg de anticuerpo/5 U de polimerasa Taq).

[0008] El desarrollo de ligandos de ácido nucleico de elevada afinidad capaces de inhibir las polimerasas Taq y Tth termoestables evitaría la necesidad del procedimiento "de arranque rápido" y superaría las limitaciones asociadas con el segundo procedimiento. Pueden desarrollarse inhibidores de ácido nucleico que son extremadamente específicos y tienen una afinidad elevada. Puesto que los ácidos nucleicos con más estables que las proteínas a temperatura ambiente, pueden evitarse los problemas de empaquetado y transporte asociados con el uso de anticuerpos. Adicionalmente, pueden identificarse ácidos nucleicos que, al igual que los anticuerpos, pierdan su afinidad por la polimerasa a temperaturas más elevadas, permitiendo la activación de la polimerasa cuando se desee. El potencial del cebado incorrecto en la PCR mediado por los propios inhibidores basados en ácidos nucleicos funcionando como cebadores (además de los cebadores específicos usados en la reacción) puede eliminarse cubriendo sus extremos 3'.

[0009] Las estructuras mediante rayos-X de cristales de varias ADN polimerasas han indicado que se pliegan en estructuras tridimensionales similares. (Para una revisión, consultar Joyce y Steitz (1994) *Annu. Rev. Biochem.* 63:777). El dominio C-terminal responsable de la polimerización se organiza en tres subdominios que representan la "palma", "dedos", y "pulgar", anatómicamente análogos a la mano derecha. La polimerasa Tth y la polimerasa Taq son un 93% similares y un 88% idénticas a nivel de secuencia de aminoácidos (Abramson (1995) en "PCR Strategies" (Academic Press, Nueva York). Ambas carecen de actividad 3'-5' exonucleasa, pero contienen actividad 5'-3' exonucleasa (Abramson (1995) en "PCR Strategies" (Academic Press, Nueva York); Tindall y Kunkel (1988) *Biochemistry* 27:6008). Por tanto, puede esperarse que los ligandos de ácido nucleico inhibidores se comporten de forma similar a ambas enzimas, así como a otras polimerasas termoestables. Esto haría posible el uso de un único

inhibidor para una cierto número de enzimas termoestables.

Selex

5 **[0010]** Se ha desarrollado un procedimiento para la evolución in vitro de moléculas de ácido nucleico con unión altamente específica a moléculas diana. Este procedimiento, Evolución Sistemática de Ligandos mediante Enriquecimiento Exponencial, denominado SELEX, se describe en la solicitud de patente estadounidense con número de serie 07/536.428, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment," actualmente abandonada, en la solicitud de patente estadounidense con número de serie 07/714,131, registrada el 10 de junio de
10 1991, titulada "Nucleic Acid Ligands," que actualmente es la patente estadounidense nº 5.475.096, en la solicitud de patente estadounidense con número de serie 07/931.473, registrada el 17 de agosto de 1992, titulada "Nucleic Acid Ligands," que actualmente es la patente estadounidense nº 5.270.163 (consultar también PCT/US91/04078). Cada una de estas solicitudes, conjuntamente denominadas en la presente invención como las Solicitudes de Patente SELEX, describe un procedimiento fundamentalmente novedoso para preparar un ligando de ácido nucleico contra
15 cualquier molécula diana deseada.

[0011] El procedimiento SELEX implica la selección de una mezcla de oligonucleótidos candidatos e iteraciones paso a paso de la unión, reparto y amplificación, usando el mismo esquema general de selección, para conseguir virtualmente cualquier criterio de afinidad de unión y selectividad deseado. Partiendo de una mezcla de ácidos
20 nucleicos, que preferiblemente comprende un segmento de una secuencia aleatoria, el procedimiento SELEX incluye los pasos de poner en contacto la mezcla con la diana en condiciones favorables para la unión, separar los ácidos nucleicos no unidos de aquellos ácidos nucleicos que se han unido específicamente a las molécula diana, disociar los complejos de ácido nucleico-diana, amplificar los ácidos nucleicos disociados a partir de los complejos de ácido nucleico-diana para rendir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en ligando, a continuación reiterar
25 los pasos de unión, reparto, disociación y amplificación a través de tantos ciclos como se desee para obtener ligandos de ácido nucleico de elevada afinidad por la molécula diana.

[0012] Se ha modificado el procedimiento SELEX básico para conseguir un cierto número de objetivos. Por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense con número de serie 07/960.093, registrada el 14 de octubre de
30 1992, titulada "Method for Selecting Nucleic Acids on the Basis of Structure," describe el uso de SELEX conjuntamente con la electroforesis en gel para seleccionar moléculas de ácido nucleico con características estructurales específicas, tales como el ADN doblado. La solicitud de patente estadounidense con número de serie 08/123.935, registrada el 17 de septiembre de 1993, titulada "Photoselection of Nucleic Acid Ligands" describe un procedimiento basado en SELEX para seleccionar ligandos de ácido nucleico que contienen grupos fotorreactivos
35 capaces de unirse a, y/o entrecruzarse con, y/o fotoinactivar una molécula diana. La solicitud de patente estadounidense con número de serie 08/134.028, registrada el 7 de octubre de 1993, titulada "High-Affinity Nucleic Acid Ligands That Discriminate Between Theophylline and Caffeine," describe un procedimiento para identificar ligandos de ácido nucleico específicos capaces de discriminar entre moléculas estrechamente relacionadas, denominado Counter-SELEX. La solicitud de patente estadounidense con número de serie 08/143.564, registrada el
40 25 de octubre de 1993, titulada "Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment: Solution SELEX," describe un procedimiento basado en SELEX que consigue un reparto altamente eficiente entre oligonucleótidos que tienen una afinidad elevada y baja por una molécula diana. La solicitud de patente estadounidense con número de serie 07/964.624, registrada el 21 de octubre de 1992, titulada "Methods of Producing Nucleic Acid Ligands," que actualmente es la patente estadounidense nº 4.496.938, describe procedimientos para obtener ligandos de ácido
45 nucleico mejorados una vez se ha realizado la SELEX. La solicitud de patente estadounidense con número de serie 08/400.440, registrada el 8 de marzo de 1995, titulada "Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment: Chemi-SELEX," describe procedimientos para unir covalentemente un ligando a su diana.

[0013] El procedimiento SELEX abarca la identificación de ligandos de ácido nucleico de elevada afinidad que
50 contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas al ligando, tales como una estabilidad in vivo mejorada, o características de suministro mejoradas. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen las sustituciones químicas en posiciones de la ribosa y/o del fosfato y/o de la base. Se describen ligandos de ácido nucleico, que contienen nucleótidos modificados, identificados mediante SELEX, en la solicitud de patente estadounidense con número de serie 08/117.991, registrada el 8 de septiembre de 1993, titulada "High Affinity
55 Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides," la cual describe oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótidos modificados químicamente en las posiciones 5'- y 2'- de las pirimidinas. La solicitud de patente estadounidense con número de serie 08/134.028, ver más arriba, describe ligandos de ácido nucleico altamente específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con 2'-amino (2'-NH₂), 2'-fluoro (2'-F), y/o 2'-O-metilo (2'-OMe). La solicitud de patente estadounidense con número de serie 08/264.029, registrada el 22 de junio de 1994,
60 titulada "Novel Method of Preparation of 2' Modified Pyrimidine Intramolecular Nucleophilic Displacement," describe oligonucleótidos que contienen varias pirimidinas modificadas en 2'.

[0014] El procedimiento SELEX abarca la combinación de oligonucleótidos seleccionados con otras unidades funcionales oligonucleotídicas y no oligonucleotídicas, según se describe respectivamente en la solicitud de patente estadounidense con número de serie 08/284.063, registrada el 2 de agosto de 1994, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Chimeric SELEX" y en la solicitud de patente estadounidense con número de serie 08/234.997, registrada el 28 de abril de 1994, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Blended SELEX". Estas solicitudes permiten la combinación de un amplio elenco de formas y otras propiedades, y las propiedades de replicación y amplificación efectiva, de los oligonucleótidos, con las propiedades deseables de otras moléculas. Cada una de las solicitudes de patente descritas anteriormente que describen modificaciones del procedimiento SELEX básico se incorporan en su totalidad específicamente por referencia en la presente invención.

[0015] WO91/19813 A (UNIV COLORADO FOUNDATION) describe los métodos de base SELEX para la producción de aptámeros dirigidos a varias proteínas, incluyendo las ADN polimerasas de T4 y VIH. EP 0592 035 A (EASTMAN KODAK CO) describe la utilización de anticuerpos inhibidoras de polimerasa para reducir el cebado erróneo ("mispriming") a baja temperatura en reacciones PCR.

Descripción resumida de la invención

[0016] La presente invención incluye procedimientos para identificar y producir ligandos de ácido nucleico para polimerasas de ADN. Específicamente se incluyen procedimientos para identificar ligandos de ácido nucleico para ADN polimerasas termoestables útiles en la Reacción en Cadena de la Polimerasa, incluyendo las polimerasas Taq y Tth, y los ligandos de ácido nucleico identificados y producidos de ese modo. Más particularmente, se proporcionan secuencias de ADN que son capaces de unirse respectivamente de forma específica a las polimerasas Taq y Tth, inhibiendo de ese modo su capacidad para catalizar la síntesis de ADN a temperatura ambiente. El procedimiento de esta descripción puede extenderse para identificar y producir ligandos de ácido nucleico para cualquier ADN polimerasa termoestable, y los ligandos identificados y producidos de ese modo.

[0017] En esta descripción se incluye además un procedimiento para identificar ligandos de ácido nucleico y secuencias de ligando de ácido nucleico para las polimerasas Taq y Tth, el cual comprende los pasos de (a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos, (b) repartir los miembros de dicha mezcla candidata en base a la afinidad por las polimerasas Taq o Tth, y (c) amplificar las moléculas seleccionadas para rendir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácido nucleico con una afinidad relativamente elevada por la unión respectivamente a las polimerasas Taq y Tth.

[0018] También se incluye en esta descripción un procedimiento mejorado para llevar a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa, el cual comprende el paso de incluir un ligando de ácido nucleico que inhibe la polimerasa termoestable a temperatura ambiente, pero que se disocia de la polimerasa a temperaturas elevadas. Ambos ligandos de ácido nucleico se identifican de acuerdo con el procedimiento de esta invención.

[0019] Más específicamente, la presente invención incluye los ligandos de ADNss contra la polimerasa Taq y polimerasa Tth identificados de acuerdo con el procedimiento descrito más arriba, incluyendo aquellos ligandos listados en las TABLAS 2-5 (SEC. Nº ID: 7-73). También se describen los ligandos de ADN para la polimerasa Taq y polimerasa Tth que son sustancialmente homólogos de cualquier de los ligandos proporcionados, y que tienen sustancialmente la misma capacidad para unir e inhibir la actividad de la polimerasa Taq y de la polimerasa Tth. También se incluyen en esta descripción los ligandos de ADN para la polimerasa Taq y polimerasa Tth que tienen sustancialmente la misma forma estructural que los ligandos presentados en la presente invención, y que tienen sustancialmente la misma capacidad para unir e inhibir la actividad de la polimerasa Taq y de la polimerasa Tth.

[0020] La presente invención incluye también secuencias de nucleótidos modificados que se basan en los ligandos de ADN identificados en la presente invención, y en mezclas de los mismos.

[0021] Los ligandos de ácido nucleico de la presente invención pueden funcionar como "interruptores" en el sentido en que "encienden" o "apagan" la Reacción en Cadena de la Polimerasa dependiendo de la temperatura de la mezcla de reacción. La presente invención, por tanto, incluye también un procedimiento para identificar y preparar secuencias de ligando de ácido nucleico y secuencias de ligando de ácido nucleico que funcionan como interruptores, el cual comprende los pasos de (a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos, (b) repartir los miembros de dicha mezcla candidata en base a la afinidad por las polimerasas Taq o Tth, y (c) amplificar las moléculas seleccionadas usando la molécula diana para rendir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácido nucleico con una afinidad relativamente elevada por la unión respectivamente a las polimerasas Taq y Tth sólo a temperaturas inferiores a la temperatura de amplificación.

[0022] Por tanto, la presente invención incluye procedimientos para la identificación de interruptores de ácido

nucleico. Los interruptores de ácidos nucleicos son ácidos nucleicos identificados mediante el proceso SELEX, en donde la propiedad deseada del ácido nucleico puede "encenderse" o "apagarse" dependiendo de la manipulación de algún parámetro del entorno. Los interruptores de ácido nucleico pueden identificarse mediante la manipulación del paso de reparto de SELEX para seleccionar ácidos nucleicos que proporcionen resultados opuestos, a menudo uniéndose a la diana, en base a una alteración en un parámetro del medio de reacción. Los ejemplos en este caso demuestran interruptores de ácidos nucleicos que se encienden y apagan en base a la temperatura, sin embargo, el procedimiento de esta invención pueden extenderse para identificar y preparar ligandos de ácido nucleico que funcionen como interruptores en base a condiciones distintas de la temperatura, incluyendo pero no limitándose al pH, la concentración de iones específicos, por ejemplo, Mg^{++} .

[0023] En particular, la presente invención proporciona un ligando de ácido nucleico para una ADN polimerasa termoestable, donde el ligando de ácido nucleico se une a dicha polimerasa y la inhibe a temperatura ambiente, aunque permite que la polimerasa se active a temperaturas elevadas, tal como se define en las reivindicaciones.

Descripción resumida de las figuras

[0024]

La FIGURA 1A muestra las afinidades de unión de grupos de ADN enriquecidos después de 12 rondas de SELEX (○) y del grupo aleatorio de ADN no seleccionado (•) para la polimerasa Taq. La FIGURA 1B muestra las afinidades de unión de grupos de ADN enriquecidos después de 10 rondas de SELEX (○) y del grupo aleatorio de ADN no seleccionado (•) para la polimerasa Tth.

La FIGURA 2A muestra un análisis de unión entrecruzada del grupo de ADN enriquecido para la polimerasa Taq (○), y del grupo de ADN enriquecido para la polimerasa Tth (•), con la polimerasa Tth. La FIGURA 2B muestra un análisis de unión entrecruzada del grupo de ADN enriquecido para la polimerasa Taq (○), y del grupo de ADN enriquecido para la polimerasa Tth (•), con la polimerasa Taq.

La FIGURA 3A ilustra una curva de unión del ligando 30 (•) y el ligando 21 (•) a la polimerasa Taq. La FIGURA 3B ilustra una curva de unión del ligando 30 (•) y el ligando 21 (○) a la polimerasa Tth.

La FIGURA 4 ilustra la polimerización del ADN.

La FIGURA 5A ilustra un ensayo de actividad polimerasa para las polimerasas Taq y Tth, llevado a cabo a temperaturas diferentes con diferentes tiempos de incubación. El ADN se resolvió en un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes. Los datos en el Panel A se obtuvieron con la polimerasa Taq y el grupo enriquecido seleccionado para la polimerasa Taq, mientras que los del Panel B se obtuvieron con la polimerasa Tth y el grupo enriquecido seleccionado para la polimerasa Tth. La plantilla sin tratar, de horquilla de ADN marcada en el extremo 5' (carril 1); la plantilla marcada en una mezcla de reacción que carece de polimerasa (carril 2); la incubación de la mezcla de reacción completa durante 24 minutos a temperatura ambiente en ausencia de (carril 3) y en presencia del grupo enriquecido (carril 4). Los carriles 5, 6, y 7 muestran las incubaciones de las mezclas de reacción completas, en presencia del grupo enriquecido, durante 5 minutos respectivamente a 37°C, 50°C y 60°C. Los carriles 8 y 9 muestran las incubaciones de las mezclas de reacción completas en presencia (carril 8) y ausencia (carril 9) del grupo enriquecido a 70°C durante 5 minutos. El carril 10 muestra la movilidad en gel del ADN del grupo marcado en el extremo. Los esquemas a la derecha de los geles ilustran las posiciones del ADN corto, marcado en su extremo, inicial y del producto extendido de la polimerasa.

Las FIGURAS 5B y 5C ilustran un segundo ensayo de actividad polimerasa para las polimerasas Taq y Tth, realizado a tres temperaturas diferentes. El ADN se resolvió en un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes. Los datos en la FIGURA 5B se obtuvieron con la polimerasa Taq, y los datos en la FIGURA 5C se obtuvieron con la polimerasa Tth. Los carriles 1-3 muestran los productos obtenidos en ausencia de cualquier inhibidor a partir de la incubación respectivamente a temperatura ambiente, a 30°C y 37°C, durante 5 minutos. Los carriles 4-6 muestran los datos obtenidos con el grupo de secuencia aleatoria no seleccionada; los carriles 7-9 con el grupo enriquecido para la polimerasa Taq; los carriles 10-12 con el grupo enriquecido para la polimerasa Tth; los carriles 13-15 con el anticuerpo Taqstart durante incubaciones de 5 minutos a las tres temperaturas indicadas. Los esquemas a la derecha indican el ADN corto inicial marcado en el extremo y el producto extendido de la polimerasa.

Las FIGURAS 5D y 5E ilustran un tercer ensayo de actividad polimerasa para las polimerasas Taq y Tth, resuelto sobre un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes. La FIGURA 5D muestra la actividad de la polimerasa Taq en presencia del grupo enriquecido que no ha sido sometido a ciclado

térmico, mientras que la FIGURA 5E muestra la actividad de la polimerasa Taq en presencia de un grupo que se ha ciclado térmicamente. Los carriles 1-5 indican la cantidad de producto formado a lo largo de incubaciones de 5 minutos respectivamente a 20°C, 25°C, 30°C, 35°C y 40°C. Los carriles 6-10 muestran la actividad de la polimerasa Taq, en presencia del grupo enriquecido, a lo largo de incubaciones de 5 minutos respectivamente a 20°C, 25°C, 30°C, 35°C y 40°C. Los esquemas a la derecha ilustran el ADN corto, marcado en el extremo, de inicio y el producto extendido de la polimerasa.

La FIGURA 6 ilustra el efecto de la temperatura sobre la inhibición de la polimerasa Taq (FIGURA 6A) y la polimerasa Tth (FIGURA 6B) mediante los ligandos TQ30 (SEC. Nº ID.: 50) y TQ21 (SEC. Nº ID.: 59) (carriles 1-10). El ADN se resolvió en un gel de poli(acrilamida) al 10% en condiciones desnaturalizantes. Los carriles 11-15 ilustran la formación de producto en ausencia de un inhibidor. El lado derecho del autorradiograma ilustra esquemáticamente la plantilla marcada en 5' antes y después de la extensión con polimerasa. Las FIGURAS 6C y 6D muestran el porcentaje de producto formado en presencia del ligando TQ21 (○) y del ligando TQ30 (●) usando respectivamente la polimerasa Taq (FIGURA 6C) y la polimerasa Tth (FIGURA 6D). La cantidad de producto se cuantificó mediante PhosphorImager y se normalizó respecto el producto formado en ausencia de un inhibidor a la misma temperatura, para obtener el porcentaje de producto (FIGURAS 6C y 6D (abscisas)).

La FIGURA 7 ilustra la inhibición reversible de la polimerasa Taq por parte del ligando TQ30 (SEC. Nº ID.: 50). El ADN se resolvió en un gel de poli(acrilamida) al 10% en condiciones desnaturalizantes. Los carriles 1-5 muestran los productos obtenidos en ausencia de cualquier inhibidor a partir de la incubación entre 20°C-40°C. Los carriles 6-10 muestran los productos formados a partir de la incubación entre 20°C-40°C en presencia del ligando TQ30 que no había sido termociclado (FIGURA 7A) y del ligando TQ30 que había sido sometido a 25 rondas de termociclado.

La FIGURA 8 ilustra el efecto de la concentración de ligando sobre la inhibición de la polimerasa Taq (FIGURA 8A) y de la polimerasa Tth (FIGURA 8B) por parte de los ligandos TQ30 (SEC. Nº ID.: 50) (●) y TQ21 (SEC. Nº ID.: 59) (○). La cantidad de producto formada en presencia de diversas concentraciones de inhibidor, en los ensayos de extensión de la plantilla, se cuantificó mediante PhosphorImager y se normalizó respecto la cantidad de producto formado en ausencia de un inhibidor, para obtener el porcentaje de producto (abscisas).

La FIGURA 9 ilustra esquemáticamente el corte de la secuencia de ADN de 97 nucleótidos (Exo-Sub) (5'-TTCGAGCGTG AATCTGAATT CGCGGCTAGC CAGCTTTTGC TG GCTAGCCG CGGTGGGAAA CTGAGGTAGG TGTTTTACACC TACCTCAG TT TCCCACC-3' (SEC. Nº ID.: 75)), con dos tallos-bucles predichos con una hebra desplazada, catalizada por la actividad 5'-3' exonucleasa de las polimerasas Taq y Tth. La polaridad de la secuencia plegada se indica mediante la flecha pequeña. El corte mediado por la actividad exonucleasa de las polimerasas de ADN se espera que ocurra cerca de la unión de la hebra desplazada y la hélice, y que resulte en dos fragmentos de 20 nucleótidos y 77 nucleótidos. Los círculos rellenos en los dos extremos de la molécula indican marcas radiactivas.

La FIGURA 10 ilustra la detección de una diana con un número bajo de copias usando la amplificación mediante la PCR estándar, la PCR "de arranque en caliente", y la amplificación mediante la PCR en presencia de los inhibidores de oligonucleótido TQ30 y TQ21 ("PCR NeXstart"). La FIGURA 10A ilustra una comparación de la amplificación realizada en condiciones estándares (carriles 1-3) con las de la PCR "de arranque en caliente" (carriles 4-6) para detectar la diana en ~ 10 y 50 copias. La FIGURA 10B ilustra una comparación de las amplificaciones de PCR realizadas en presencia de oligonucleótido no específico (NS) (carriles 1-3), con las del TQ21 (carriles 4-6) y TQ30 (carriles 7-9) para detectar la diana en ~ 10 y 50 copias. La FIGURA 10C ilustra la detección de una diana con un número bajo de copias (según se indica) en presencia de los inhibidores oligonucleotídicos TQ21 y TQ30. En ambas (B) y (C), los inhibidores oligonucleotídicos se usaron a una concentración de 50 nM. M indica los estándares de peso molecular. Las flechas en cada panel muestran la posición en los geles del ADN de 203 p.b. específico de la diana.

La FIGURA 11 ilustra el efecto de la concentración de ligandos truncados, Trunc.1-30 (SEC. Nº ID.: 75) (●), Trnc.2-30 (SEC. Nº ID.: 76) (■) y Trnc.3-30 (SEC. Nº ID.: 77) (○), sobre la actividad de la polimerasa Taq. La cantidad de producto formada en presencia de diversas concentraciones de inhibidor se cuantificó mediante PhosphorImager, y se normalizó respecto la cantidad de producto formado en ausencia de un inhibidor para obtener el porcentaje de producto (abscisas).

La FIGURA 12 ilustra el efecto de la concentración de inhibidor de los ligandos truncados, Trunc.1-30 (●), Trnc.2-30 (■) y Trnc. 3-30 (▲), sobre la actividad del fragmento Stoffel. La cantidad de producto formada

en presencia de diversas concentraciones de inhibidor se cuantificó mediante PhosphorImager, y se normalizó respecto la cantidad de producto formado en ausencia de un inhibidor para obtener el porcentaje de producto (abscisas).

La FIGURA 13 ilustra las características de afinidad e inhibición del ligando truncado Trnc.21 (SEC N° ID.: 70). La FIGURA 13A ilustra una curva de unión del ligando Trnc.21 a la polimerasa Taq. La FIGURA 13B ilustra el efecto de la concentración de Trnc.21 sobre la actividad de la polimerasa Taq (•) y la polimerasa Tth (○). Los valores IC_{50} para la polimerasa Taq y la polimerasa Tth son respectivamente 21 y 36.5 nM. La FIGURA 13C ilustra el efecto de la temperatura sobre la inhibición de la polimerasa Taq (•) y de la polimerasa Tth (○) por parte del Trnc.21. La cantidad de producto formado en presencia del inhibidor a una temperatura determinada se normalizó respecto a la formada en ausencia de un inhibidor a la misma temperatura para obtener el porcentaje de producto. Los valores de IT_{50} calculados para la polimerasa Taq y la polimerasa Tth son respectivamente 34°C y 35,6°C.

La FIGURA 14 ilustra la afinidad y características de inhibición del homodímero (D.30-D.30) (SEC N° ID.: 71). La FIGURA 14A ilustra una curva de unión para el homodímero (D.30-D.30) a la polimerasa Taq ($K_d = 47,5 \pm 5$ pM). La FIGURA 14B ilustra el efecto de las concentraciones de ligando dimérico (•) y monomérico (○) sobre la actividad de la polimerasa Taq. El valor de IC_{50} del Trnc.2-30 (monómero) es 48 nM, mientras que el del D.30-D.30 (dímero) es 14 nM.

La FIGURA 15 ilustra las características de inhibición del heterodímero D.21-D.30 (SEC N° ID.: 72). La FIGURA 15A ilustra el efecto de la concentración de D.21-D.30 sobre la actividad de la polimerasa Taq (•) y la polimerasa Tth (○). Los valores de IC_{50} para la inhibición de estas dos polimerasas son aproximadamente 30 nM. La FIGURA 15B ilustra el efecto de la temperatura sobre la inhibición de la polimerasa Taq (•) y de la polimerasa Tth (○) por parte del heterodímero D.21-D.30. El valor de IT_{50} para la polimerasa Taq es 41°C, mientras que para la polimerasa Tth es 34,5°C.

La FIGURA 16 ilustra el efecto de los dNTS y del ADN plantilla en horquilla sobre la afinidad de unión del Trnc.21 a la polimerasa Taq. FIGURA 16A. Análisis de unión a filtro de nitrocelulosa del Trnc.21 en presencia de dNTP 1 mM. Los círculos rellenos (•) indican la unión en ausencia de plantilla de ADN en horquilla, mientras que los círculos vacíos (○) indican la unión en presencia de plantilla de ADN en horquilla 250 nM. Los valores de K_d calculados en estas condiciones son aproximadamente 2,5 nM. La FIGURA 16B ilustra el efecto de la concentración de dNTO sobre la unión del Trnc.21 a la polimerasa Taq. En este experimento la unión de Trnc.21 marcado radiactivamente a polimerasa Taq 1 nM se monitorizó en presencia de diferentes concentraciones de dNTP.

Descripción detallada de la invención

[0025] Esta solicitud describe el aislamiento de ligandos de ácido nucleico a polimerasas de ADN. Específicamente, esta solicitud describe el aislamiento de ligandos de ácido nucleico a polimerasas termoestables útiles en la Reacción en Cadena de la Polimerasa. En una realización preferida, la ADN polimerasa se selecciona de entre la polimerasa Taq o polimerasa Tth, no obstante, el procedimiento de esta invención puede ampliarse a la identificación y purificación de ligandos de ácido nucleico de elevada afinidad para cualquier polimerasa de ADN termoestable. Los ligandos de ácido nucleico se identificaron a través del procedimiento conocido como SELEX. SELEX se describe en la solicitud de patente estadounidense con número de serie 07/536.428, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment," actualmente abandonada, en la solicitud de patente estadounidense con número de serie 07/714.131, registrada el 10 de junio de 1991, titulada "Nucleic Acid Ligands," que actualmente es la patente estadounidense n° 5.475.096, en la solicitud de patente estadounidense con número de serie 07/931.473, registrada el 17 de agosto de 1992, titulada "Nucleic Acid Ligands," que actualmente es la patente estadounidense n° 5.270.163 (consultar también PCT/US91/04078). Estas solicitudes se denominan conjuntamente las Solicitudes de Patentes SELEX.

[0026] En su forma más básica, el proceso SELEX puede definirse por la siguiente serie de pasos:

1) Se preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos con secuencias diferentes. La mezcla candidata generalmente incluye regiones de secuencias fijas (es decir, cada uno de los miembros de la mezcla candidata contiene las mismas secuencias en la misma ubicación) y regiones de secuencias aleatorias. Las regiones de secuencia fija se seleccionan: (a) para ayudar en los pasos de amplificación descritos más abajo, (b) para imitar una secuencia que se sabe se une a la diana, o (c) para potenciar la concentración de una determinada disposición estructural de los ácidos nucleicos en la mezcla candidata. Las secuencias aleatorias pueden ser totalmente aleatorias (es decir, la probabilidad de hallar una base en cualquier posición es de una sobre cuatro) o sólo parcialmente aleatoria (por ejemplo, la

probabilidad de hallar una base en cualquier ubicación puede seleccionarse a cualquier nivel entre el 0 y 100 por ciento).

2) La mezcla candidata se pone en contacto con la diana seleccionada en condiciones favorables a la unión entre la diana y los miembros de la mezcla candidata. En estas circunstancias, puede considerarse que la interacción entre la diana y los ácidos nucleicos de la mezcla candidata es formadora de pares ácido nucleico-diana entre la diana y aquellos ácidos nucleicos que tienen la afinidad más intensa por la diana.

3) Los ácidos nucleicos con la afinidad más elevada por la diana se separan de los ácidos nucleicos con una afinidad menor por la diana. Puesto que en la mezcla candidata sólo un número extremadamente pequeño de secuencias (y posiblemente sólo una molécula de ácido nucleico) correspondiente a los ácidos nucleicos con la máxima afinidad, generalmente es deseable establecer el criterio de reparto de tal forma que una cantidad significativa de ácidos nucleicos en la mezcla candidata (aproximadamente el 5-10%) sea retenida durante el reparto.

4) Aquellos ácidos nucleicos seleccionados durante el reparto como poseedores de una afinidad relativamente elevada por la diana se amplifican a continuación para crear una nueva mezcla candidata que está enriquecida en ácidos nucleicos que tienen una afinidad relativamente elevada por la diana.

5) Repitiendo los pasos de reparto y amplificación anteriores, la mezcla candidata nuevamente formada contiene menos y menos secuencias únicas, y el grado promedio de afinidad de los ácidos nucleicos por la diana generalmente incrementará. Llevado al extremo, el proceso SELEX rendirá una mezcla candidata que contendrá una o un número pequeño de ácidos nucleicos únicos que representarán los ácidos nucleicos de la mezcla candidata original que tienen la afinidad más elevada por la molécula diana.

[0027] Las Solicitudes de Patente SELEX describen y elaboran este proceso con gran detalle. Se incluyen dianas que pueden usarse en el proceso; procedimientos para repartir ácidos nucleicos en una mezcla candidata; y procedimientos para amplificar ácidos nucleicos seleccionados para generar mezclas candidatas enriquecidas. Las Solicitudes de Patentes SELEX también describen ligandos obtenidos para un cierto número de especies dianas, incluyendo dianas proteicas en donde la proteína es y no es una proteína unidora de ácido nucleico.

[0028] El proceso SELEX proporciona ligandos de elevada afinidad de una molécula diana. Esto representa un logro singular que no tiene precedentes en el campo de la investigación en ácidos nucleicos. La presente invención aplica el procedimiento SELEX a las dianas específicas de los inhibidores de ácido nucleico de las ADN polimerasas, particularmente las polimerasas Taq y Tth. En la sección de ejemplos de más abajo, se describen los parámetros experimentales usados para aislar e identificar los inhibidores de ácido nucleico de las polimerasas Taq y Tth.

[0029] En la solicitud de patente estadounidense pendiente de tramitación, y en condiciones normales concedida, con número de serie nº 07/964.624, registrada el 21 de octubre de 1992 ('624), que actualmente es la patente estadounidense nº 5.496.938, se describen procedimientos para obtener ligandos de ácido nucleico mejorados una vez se ha realizado la SELEX.

[0030] Ciertos términos usados para describir la invención en la presente memoria se definen como sigue:

"Ligando de ácido nucleico" tal y como se utiliza en la presente invención es un ácido nucleico que ocurre de forma no natural y que tiene una acción deseable sobre una diana. Una acción deseable incluye, pero no se limita a la unión de la diana, cambiar catalíticamente la diana, reaccionar con la diana de una forma que modifica/altera la diana o la actividad funcional de la diana, unirse covalentemente a la diana como en un inhibidor suicida, facilitar la reacción entre la diana y otra molécula. En la realización preferida, la acción tiene afinidad de unión específica por una molécula diana, siendo semejante molécula diana una estructura química tridimensional distinta de un polinucleótido, la cual se une al ligando de ácido nucleico a través de un mecanismo que predominantemente depende del emparejamiento de bases de Watson/Crick o de la unión de la triple hélice, en donde el ligando de ácido nucleico no es un ácido nucleico que tienen la función fisiológica conocida de ser unido por la molécula diana. Los ligandos de ácido nucleico incluyen los ácidos nucleicos que son identificados a partir de una mezcla candidata de ácidos nucleicos, siendo dicho ligando de ácido nucleico un ligando de una diana determinada, mediante el procedimiento que comprende: a) poner en contacto la mezcla candidata con la diana, en donde los ácidos nucleicos que tienen una afinidad incrementada por la diana respecto a la mezcla de candidatos pueden separarse del resto de la mezcla de candidatos; b) separar los ácidos

nucleicos de afinidad incrementada del resto de la mezcla de candidatos; y c) amplificar los ácidos nucleicos de afinidad incrementada para rendir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en ligando.

"Mezcla de candidatos" es una mezcla de ácidos nucleicos de secuencias diferentes, de la cual se selecciona un ligando deseado. La fuente de una mezcla de candidatos puede ser ácidos nucleicos, o fragmentos de los mismos, que ocurren de forma natural, ácidos nucleicos sintetizados químicamente, ácidos nucleicos sintetizados enzimáticamente, o ácidos nucleicos preparados mediante una combinación de las técnicas precedentes. En una realización preferida, cada ácido nucleico tiene secuencias fijas que rodean una región aleatoria para facilitar el proceso de amplificación.

"Ácido nucleico" significa ADN, ARN, de hebra sencilla o de doble hebra, y cualquier modificación química de los mismos. Las modificaciones incluyen, pero no se limitan a las que proporcionan otros grupos químicos que incorporan una carga, polarizabilidad, puentes de hidrógeno, interacción electrostática, y fluxionalidad adicional a las bases del ligando de ácido nucleico o al ligando de ácido nucleico en su conjunto. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a las modificaciones del azúcar en la posición 2', las modificaciones de la pirimidina en la posición 5, las modificaciones de la purina en la posición 8, las modificaciones en las aminas exocíclicas, la sustitución de la 4-tiouridina, la sustitución del 5-bromo o 5-yodo-uracilo, las modificaciones del esqueleto, las metilaciones, las combinaciones de emparejamiento de bases inusuales, tales como las isobases de isocitidina e isoguanidina y similares. Las modificaciones incluyen también las modificaciones 3' y 5' tales como el recubrimiento (capping).

La metodología **"SELEX"** implica la combinación de la selección de ligandos de ácido nucleico, los cuales interactúan con una diana de una manera deseable, por ejemplo, uniéndose a una proteína, con la amplificación de los ácidos nucleicos seleccionados. La iteración cíclica de los pasos de selección/amplificación permite la selección de uno o un número pequeño de ácidos nucleicos, los cuales interactúan con la diana con la máxima intensidad, de entre un grupo que contiene un número muy elevado de ácidos nucleicos. Los ciclos del proceso de selección/amplificación se continúan hasta que se alcanza un objetivo seleccionado. En la presente invención, la metodología SELEX se emplea para obtener ligandos de ácido nucleico para las polimerasas Taq y Tth.

[0031] La metodología SELEX se describe en las Solicitudes de Patentes SELEX.

[0032] "Diana" significa cualquier compuesto o molécula de interés para la cual se desea un ligando. Una diana puede ser una proteína, un péptido, un carbohidrato, un polisacárido, una glicoproteína, una hormona, un receptor, un antígeno, un anticuerpo, un virus, un sustrato, un metabolito, un análogo de estado de transición, un cofactor, un inhibidor, un fármaco, un colorante, un nutriente, un factor de crecimiento, etcétera, sin limitación. En esta solicitud, la diana es una ADN polimerasa. En una realización preferida la ADN polimerasa es la polimerasa Taq y la polimerasa Tth.

[0033] Un **"ligando lábil"** tal y como se utiliza en la presente invención es un ligando de ácido nucleico identificado mediante el proceso SELEX, el cual tiene una afinidad enormemente disminuida por su diana en base a un ajuste de un parámetro del entorno. En la realización preferida, el parámetro del entorno es la temperatura, y la afinidad de un ligando por su diana está disminuida a temperaturas elevadas.

[0034] "ADN polimerasa" tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a cualquier enzima que cataliza la síntesis de ADN mediante la adición de unidades de desoxirribonucleótido a una cadena de ADN, usando ADN o ARN (transcriptasa inversa) como plantilla. Las ADN polimerasas termoestables se aíslan de microorganismos que prosperan a temperaturas superiores a 40°C.

[0035] Un **"interruptor"** se refiere a cualquier compuesto que funciona para "encender" o "apagar" una reacción dependiendo de alguna condición o condiciones de reacción específicas. En la presente invención, los ligandos de ácido nucleico funcionan para "encender" o "apagar" la PCR dependiendo de la temperatura de la reacción. Un interruptor puede operar en base a otras condiciones de reacción, incluyendo el pH, la fuerza iónica, o la presencia o ausencia de iones específicos. Los interruptores de ácido nucleico se identifican mediante el procedimiento SELEX a través de la selección apropiados de técnicas de reparto. Los parámetros de reparto se determinan con objeto de que se seleccionen ácidos nucleicos que tienen las características interruptoras deseadas.

[0036] En la presente invención, el experimento SELEX se realizó con objeto de identificar ligandos de ácido nucleico con elevada afinidad específica por las polimerasas Taq y Tth a partir de una biblioteca degenerada que contenía 30 posiciones aleatorias (30N) (EJEMPLO 1). Aunque pueden identificarse ligandos de ARN o ADN para este propósito, los ejemplos siguientes describen la identificación de ligandos de ADN. El experimento SELEX se

diseño para identificar oligonucleótidos que unen e inhiben las polimerasas a baja temperatura (temperatura ambiente), pero no a temperaturas más elevadas (>40°C). Esto se consiguió usando la polimerasa diana para amplificar las moléculas seleccionadas por afinidad en la PCR a una temperatura elevada. En semejantes condiciones, no se esperaba que las secuencias de ADN que inhiben las polimerasas Taq y Tth a temperatura elevada se amplificaran y propagaran durante la selección. Esta invención incluye los ligandos de ADNss específicos para la polimerasa Tth mostrados en la TABLA 3 (SEC. Nº ID.: 7-35) y la polimerasa Taq mostrados en la TABLA 3 (SEC. Nº ID.: 36-66, 76, 77), y los ligandos de ácido nucleico mostrados en las TABLAS 4 y 5 (SEC. Nº ID.: 67-74), identificador mediante los procedimientos descritos en el EJEMPLO 1. Esta invención incluye además ligandos de ADN para las polimerasas Taq y Tth que inhiben la función de las polimerasas Taq y Tth.

[0037] El ámbito de los ligandos cubierto por esta descripción se extiende a todos los ligandos de ácido nucleico de las polimerasas Taq y Tth, modificados y no modificados, identificados de acuerdo con el procedimiento SELEX. Más específicamente, esta descripción incluye las secuencias de ácido nucleico que son sustancialmente homólogas a los ligandos mostrados en las TABLAS 2-5. Por sustancialmente homólogas se quiere significar un grado de homología de secuencia primaria superior al 70%, más preferiblemente superior al 80%. Una revisión de las homologías de secuencia de los ligandos de Taq y Tth mostrados en las TABLAS 2-5 muestra que las secuencias con poca o ninguna homología primaria pueden tener sustancialmente la misma capacidad para unir respectivamente la polimerasa Taq y Tth. Por estas razones, esta descripción incluye también ligandos de ácido nucleico que tienen sustancialmente la misma capacidad para unir las polimerasas Taq y Tth que los ligandos de ácido nucleico mostrados en las TABLAS 2-5. Sustancialmente la misma capacidad para unir la polimerasa Taq o Tth significa que la afinidad se halla dentro de unos pocos órdenes de magnitud de la afinidad de los ligandos descritos en la presente invención. Entre las capacidades de los especialistas con formación ordinaria en la técnica se halla claramente el establecer si una secuencia determinada --sustancialmente homóloga con las descritas específicamente en la presente invención-- tiene sustancialmente la misma capacidad para unir respectivamente las polimerasas Taq y Tth.

[0038] Esta descripción incluye también los ligandos tal y como se han descrito más arriba, en donde dichos ligandos inhiben la función de otras polimerasas de ADN termoestables, incluyendo, pero no limitándose al fragmento Stoffel, la polimerasa Tbr, la polimerasa Tlf, y la transcriptasa inversa de M-MLV.

[0039] Esta descripción incluye también los ligandos tal y como se ha descrito más arriba, en donde ciertas modificaciones químicas se realizan con objeto de incrementar la estabilidad in vivo o in vitro del ligando, o para potenciar o mediar la unión u otras características deseables del ligando, o el suministro del ligando. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen las sustituciones químicas en posiciones del azúcar y/o del fosfato y/o de la base de una determinada secuencia de ácido nucleico. Consultar, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense con número de serie 08/117.991, registrada el 9 de septiembre de 1993, titulada "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides." Otras modificaciones son conocidas por alguien con formación ordinaria en la técnica. Tales modificaciones pueden hacerse después de la SELEX (modificación de ligandos sin modificar identificados previamente) o por incorporación en el proceso de SELEX.

[0040] Los ligandos de ácido nucleico para las polimerasas Taq y Tth descritos en la presente invención son útiles como reactivos en la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

[0041] La presente descripción incluye un procedimiento mejorado para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa, en donde una muestra que contiene una secuencia de ácido nucleico que ha de amplificarse se mezcla con 1) cebadores que son complementarios de secuencias que flanquean la secuencia a amplificar, 2) una polimerasa termoestable, y 3) un ligando de ácido nucleico que es capaz de inhibir la polimerasa a temperaturas ambiente. El ligando de ácido nucleico inhibidor puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. A continuación se siguen los pasos normales de la PCR --fundido, hibridación y síntesis-- mediante iteración cíclica térmica de la mezcla. La presencia del ligando de ácido nucleico impide que la mezcla amplifique el ADN de fondo, impidiendo cualquier síntesis a temperaturas inferiores antes o durante la iteración. La presente invención incluye también un equipo de PCR que comprende una ADN polimerasa termoestable y un ligando de ácido nucleico que inhibe dicha polimerasa a temperaturas ambiente, aunque permite que ocurra la síntesis durante los ciclos de temperatura elevada del proceso de la PCR. La presente invención incluye también un procedimiento para mejorar la PCR, tal y como será entendido por los especialistas en la técnica, incluyendo el paso de añadir a la polimerasa termoestable un ligando de ácido nucleico que inhibe dicha polimerasa a temperaturas ambiente, aunque permite que ocurra la síntesis durante los ciclos de temperatura elevada del proceso de la PCR.

Ligandos de ácido nucleico para las polimerasas Taq y Tth.

[0042] El EJEMPLO 1 describe los procedimientos experimentales usados en la selección de ligando de ácido nucleico para ambas, las polimerasas Taq y Tth. En la TABLA 2 se detallan las secuencias de ADNss obtenidas de

10 rondas de selección realizadas con la polimerasa Tth. Se secuenciaron veintinueve clones individuales procedentes de la selección con polimerasa Tth (sólo la región de nucleótidos variable se muestra en la TABLA 2). Los ligandos se agruparon en familias basadas en homología de secuencia primaria.

- 5 **[0043]** Las secuencias de ADNss obtenidas de 12 rondas de selección realizadas con la polimerasa Taq se detallan en la TABLE 3. De las cuarenta y dos secuencias analizadas de la selección con la polimerasa Taq, treinta y tres eran únicas. Las letras mayúsculas indican la región aleatoria de 30 nucleótidos que está flanqueada por las regiones de secuencia fija 5'-TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGC- y -TCTTGTGTAT GATTCGCTTT TCCC-3' para formar las secuencias de longitud completa. Las letras minúsculas en algunas de las secuencias indican la
- 10 secuencia 5' fija. El número de clones portadores de la misma secuencia se indica entre paréntesis. Las secuencias se agruparon en tres familias en base a la similitud de secuencia. Los motivos de secuencia conservados en las familias I y II están encuadrados. Ambas familias contenían una secuencia consenso diferente; 5'-A/GA/GTGTG/A CAGTAT/GC-3' para la Familia I, y 5'-A/GCGTTTTG-3' para la Familia II. En la Familia I, las regiones 5' y 3' de la secuencia consenso mostraron potencial para el emparejamiento de bases entre ellas (subrayadas en la
- 15 TABLA 3). Adicionalmente, la covariación observada en estas regiones sugiere la existencia de una posible estructura tallo-bucle. En la mayoría de los ligandos las regiones de emparejamiento potencial de bases se extendía más allá de la región consenso. Por contra, los ligandos de la Familia II no tienen un motivo estructura secundario obvio.
- 20 **[0044]** Las curvas de unión representativas del clon 30 (TQ30 (SEC. Nº ID.: 50)) de la Familia I y del clon 21 (TQ21 (SEC. Nº ID.: 59)) de la Familia II, se muestran en la FIGURA 3. En ambos casos, los ligandos muestran una unión estrecha a las dos polimerasas, con valores de K_d en el rango picomolar bajo; los valores de K_d del TQ30 son ± 1 pM para la polimerasa Taq y 28 ± 4 pM para la polimerasa Tth, mientras que los del TQ21 son 36 ± 4 pM y 10 ± 2 pM respectivamente para las polimerasa Taq y la polimerasa Tth. Se examinaron varios ligandos mas de las dos
- 25 familias. Los valores de K_d oscilaron de 0,04 a 9 nM para la polimerasa Taq y de 0,01 a 0,3 nM para la polimerasa Tth.

Ensayos de inhibición de polimerasa: polimerasa Taq y Tth.

- 30 **[0045]** El EJEMPLO 2 (FIGURAS 5-9) describe un cierto número de ensayos de inhibición de la polimerasa y demuestra que los ligandos de la invención son capaces de inhibir la interacción de ambos, las polimerasas Taq y Tth, a temperaturas inferiores a 40°C. En el EJEMPLO 2, el ADN en horquilla diseñado (DNA-HP; 5'-ATGCCTAAGT TTGGAACGCG GCTAGCCAGC TTTTGCTGGC TAGCCGCGT-3' (SEC. Nº ID.: 6) se usa como una plantilla para medir la capacidad de los grupos de ADN enriquecidos, así como, de los ligandos TQ30 (SEC. Nº ID.: 50) y TQ21
- 35 (SEC. Nº ID.: 59) procedentes de la selección con polimerasa Taq, para inhibir la actividad polimerasa en una variedad de condiciones. Este ensayo detecta la síntesis de relleno, dirigida por la plantilla, de 15 nucleótidos sobre una horquilla de ADN plegada hacia atrás.
- [0046]** La FIGURA 5A muestra los resultados de los ensayos de inhibición llevados a cabo a diferentes
- 40 temperaturas con diferentes tiempos de incubación usando los grupos enriquecidos de ligandos de ADN. La actividad de ambas, las polimerasas Taq y Tth es generalmente bajo a temperaturas bajas, e incrementa a medida que la temperatura se incrementa, como puede observarse comparando el carril 3 (reacción a temperatura ambiente) con los carriles 6-9 (reacción a 50, 60 y 70°C, respectivamente). Los grupos enriquecidos inhiben la actividad de sus respectivas polimerasas a temperatura ambiente (carril 4), pero no a 50°C-70°C. El carril 10 muestra
- 45 la movilidad del grupo marcado radiactivamente como una referencia para detectar la posible extensión de moléculas de ADN en el grupo que puedan servir como plantilla para las polimerasas. La ausencia de bandas marcadas radiactivamente migrando en la proximidad o por encima del grupo marcado en los carriles 6-9 indica la ausencia de polimerización del grupo de ADNss.
- 50 **[0047]** Puesto que la actividad de las polimerasas termoestables es baja a temperatura ambiente, el período de incubación en el ensayo se incrementó hasta 16 horas. Las FIGURAS 5B y 5C muestran los resultados de la incubación de 16 horas de la plantilla con la dos polimerasas en presencia de grupos seleccionados y del grupo aleatorio. Además, la inhibición mediada por grupos seleccionados se comparó con la del anticuerpo anti-Taq (Taqstart). Los datos en la FIGURA 5B se obtuvieron con la polimerasa Taq, y los datos en la FIGURA 5C se
- 55 obtuvieron con la polimerasa Tth. En las tres temperaturas estudiadas, temperatura ambiente, 30°C y 37°C, el grupo aleatorio no mostró inhibición de las dos polimerasas (comparar los carriles 1-3 con 4-6), sugiriendo que la inhibición causada por el grupo enriquecido es específica de la secuencia. El grupo seleccionado para la polimerasa Taq inhibió completamente la actividad polimerasa a lo largo de una incubación de 16 horas a temperatura ambiente (carril 7), pero no a 30°C y más (carriles 8 & 9). Aunque el grupo seleccionado para la polimerasa Tth mostró unión a
- 60 la polimerasa Taq, fue incapaz de inhibir la polimerasa Taq (carriles 10-12). Tal y como se esperaba, el anticuerpo Taqstart inhibió la actividad polimerasa a las tres temperaturas investigadas (carriles 12-15). Sin embargo, el grupo del ADNss seleccionado para la polimerasa Tth no inhibió la actividad enzimática a lo largo de una incubación de 16

horas (comparar los carriles 1-3 con 4-6). Por contra, el mismo grupo fue capaz de inhibir la actividad enzimática a lo largo de períodos breves de incubación. El grupo seleccionado para la polimerasa Taq fue capaz de inhibir parcialmente (> 50%) la actividad Tth a lo largo de una incubación de 16 horas a temperatura ambiente (carril 10). El anticuerpo Taqstart no tuvo efecto alguno sobre la actividad de la Tth (carriles 13-15).

[0048] El uso del anticuerpo Taqstart está limitado a una vez en una reacción de la PCR. Una vez se ha desnaturalizado a temperatura elevada no puede renaturalizarse de vuelta a su forma nativa. Sin embargo, los ligandos de ácido nucleico con estructuras secundarias simples tiene el potencial de renaturalizarse de vuelta a su forma nativa después de superar un ciclo térmico. Se llevó a cabo un experimento para investigar si la capacidad inhibidores del grupo de ADN seleccionado para la polimerasa Taq podía restablecerse después del calentamiento (FIGURAS 5D y 5E). La FIGURA 5D muestra la inhibición de la actividad Taq entre 20°C-40°C por parte del grupo de ADN seleccionado que no ha sido sometido a termociclado. A lo largo de 45 minutos de incubación, el grupo inhibió completamente la actividad Taq a 20°C y 25°C. Durante este período relativamente corto de incubación, el grupo exhibió >70% de inhibición a 30°C. Puede observarse un perfil de inhibición muy similar con el grupo de ADN que se ha sometido a dos ciclos de la PCR con la polimerasa Taq en ausencia del ADN plantilla. Este resultado demuestra que la inhibición mediada por el ADNss es reversiblemente sensible a la temperatura y que puede restablecerse incluso después de la PCR.

[0049] La FIGURA 6 muestra el rango de temperaturas en las cuales las secuencias TQ30 (SEC. Nº ID.: 50) y TQ21 (SEC. Nº ID.: 59) (TABLA 3) son inhibidores de las ADN polimerasas Taq y Tth. Los ensayos de extensión de la horquilla representados en esta figura se realizaron a las temperaturas indicadas, durante 1 hora, usando 250 nM del ligando respectivo (carriles 1-10). Tal y como se anticipaba, los ligandos de ADNss no inhibieron ninguna polimerasa a temperaturas >40°C (FIGURAS 6A y 6B). Las temperaturas a las que se genera el 50% del producto durante el ensayo de una hora (valores IT_{50}) para el ligando TQ30 son respectivamente 41°C y 29°C para las polimerasas Taq y Tth. Los valores respectivos para el ligando TQ21 son 37°C y 29°C. Las afinidades de unión de los dos ligandos para estas polimerasas disminuyen a temperaturas más elevadas (no se muestran los datos), de acuerdo con su actividad inhibidora disminuida a temperatura elevada. En los ensayos de extensión de la horquilla, aproximadamente el 2% de la plantilla en horquilla inicial no fue extendida por la ADN polimerasa, presumiblemente debido a un plgado incorrecto.

[0050] La FIGURA 7 ilustra que la inhibición de la polimerasa Taq por parte del ligando TQ30 (SEC. Nº ID.: 50) es térmicamente reversible, y que puede restablecerse incluso después de la CR. Los ensayos de extensión de la horquilla representados en esta figura se realizaron a las temperaturas indicadas, durante 10 minutos, en un volumen de reacción de 100 µl, con 5 U de polimerasa Taq, en ausencia (carriles 1-5) y en presencia (carriles 6-10) de ligando TQ30 (50 nM). En la FIGURA 7A, el ligando TQ30 no se ha sometido a termociclado. En la FIGURA 7B, el ligando TQ30 se sometió a 25 rondas de termociclado con polimerasa Taq (30 segundos a 90°C; 1 minuto a 50°C, 30 segundos a 72°C) y se enfrió a temperatura ambiente antes de añadir la plantilla en horquilla marcada radiactivamente (250 nM). Como puede observarse en la FIGURA 7, en ambos casos el ligando TQ30 inhibió la polimerasa a temperaturas inferiores a 40°C. Adicionalmente, la muestra que experimentó el termociclado mostró una inhibición idéntica o más efectiva que la muestra no sometida a termociclado.

[0051] La FIGURA 8 demuestra el efecto de la concentración de ligando sobre la inhibición de las polimerasas Taq y Tth. La concentración de inhibidor necesaria para producir el 50% del producto en el ensayo de horquilla (valores IC_{50}) para el TQ30 (SEC. Nº ID.: 50) y TQ21 (SEC. Nº ID.: 59) fue respectivamente 6,5 nM y 10 nM para la inhibición de la polimerasa Taq a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) a lo largo de una incubación de 16 horas (FIGURA 8A). Puesto que la concentración de polimerasa Taq usada en el ensayo es 12,5 nM, la inhibición del enzima por parte del TQ30 (SEC. Nº ID.: 50) es probable que sea el resultado de una unión estequiométrica. Cuando se ensayó a 30°C a lo largo de 1 hora, los valores de IC_{50} incrementaron aproximadamente tres veces (22 nM para el TQ30 y 67 nM para el TQ21; no se muestran los datos). Los valores de IC_{50} del TQ30 y TQ21 para la inhibición de la polimerasa Tth fueron respectivamente 60 y 36 nM, a temperatura ambiente (FIGURA 8B). En conjunto, estos oligonucleótidos son inhibidores más efectivos para la polimerasa Taq, el enzima usado en la selección, que para la polimerasa Tth.

[0052] Para excluir la posibilidad de que la inhibición observada de la extensión de la plantilla se deba a la unión preferente de ligandos seleccionados a la polimerasa, y a su utilización subsiguiente como sustrato, se incubaron los ligandos TQ21 y TQ30 marcados radiactivamente con las dos ADN polimerasas durante 16 horas (EJEMPLO 2, no se muestran los datos). El ligando TQ30 no mostró productos de extensión a partir de su incubación con cualquiera de las enzimas, indicando que no es un sustrato de la actividad polimerasa. Sin embargo, el TQ21 dio lugar a una banda de peso molecular más elevado, indicativa de una extensión de secuencia a partir de su incubación con ambas polimerasas. La extensión parcial observada del ligando TQ21 se eliminó efectivamente bloqueando la disponibilidad del grupo 3'-OH mediante el recubrimiento del extremo 3' con un engarce de etilenglicol usando condiciones estándares. Las construcciones de oligonucleótidos recubiertas en 3' son inhibidores tan efectivos

como las moléculas sin recubrir (no se muestran los datos). Estos resultados indican que los ligandos de ADNss son sustratos pobres para la actividad polimerasa, y que los dos tipos de ligandos probablemente se colocan sobre las ADN polimerasas de forma diferente; el TQ21 se une a la polimerasa de tal forma que su extremo 3' puede ser prolongado (aunque pobremente), mientras que el TQ30 no puede ser extendido después de su unión.

Experimento de Captura por Afinidad.

[0053] La reversibilidad térmica de la interacción de los ligandos de ácido nucleico con las polimerasas Taq y Tth plantea la posibilidad de usar una matriz de afinidad generada con tales ligandos, para capturar la polimerasa después de una amplificación, para usarla en una amplificación subsiguiente. Para investigar la posibilidad de la captura por afinidad, se prepararon cuentas de afinidad que contenían los ligandos TQ30 (SEC. Nº ID.: 50) y TQ21 (SEC. Nº ID.: 59) según se describe en el EJEMPLO 1. Después de la extensión de la plantilla en horquilla con las polimerasas Taq y Tth en un tampón de PCR que contenía heparina, se mezcló la reacción con cuentas de afinidad o cuentas control según se describe en el EJEMPLO 2, las cuentas se lavaron minuciosamente y se expusieron a continuación a una alícuota reciente de mezcla de reacción que contenía todos los reactivos excepto la polimerasa. Después de incubarlas durante 5 minutos adicionales a 70°C para permitir la extensión sobre la plantilla recién añadida, las mezclas de reacción se analizaron sobre un gel de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturalizantes. En las mezclas de reacción que contenían las cuentas control no hubo extensión de la plantilla en la segunda ronda de amplificación. Por contra, en las mezclas de reacción que contenían cuentas de afinidad no hubo diferencia en los productos de extensión en ambas la primera y segunda ronda de amplificación, indicando que las cuentas de afinidad contenían ambos, el ligando TQ30 (SEC. Nº ID.: 50) y el TQ21, exitosamente capturaban la dos polimerasas después de la primera ronda de la PCR.

Efecto de los ligandos TQ30 y TQ21 sobre la actividad exonucleasa de las polimerasas Taq y Tth.

[0054] Tal y como se ha discutido más arriba, además de su capacidad para catalizar la síntesis de polinucleótidos, tanto la polimerasa Taq como la polimerasa Tth poseen también actividad exonucleasa 5'-3' (Joyce y Steitz (1987) Trends Biochem. Sci. 12:288; Longley et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18:7317). El sustrato preferido para la actividad exonucleasa 5'-3' es un ADNss desplazado (o una estructura parecida a un tenedor) teniendo lugar el corte cerca de la unión dúplex/ADNss. Para estudiar el efecto de los inhibidores de oligonucleótidos sobre la actividad exonucleasa 5'-3' de las polimerasas, se diseñó un sustrato de ADN (Exo-Sub) que contenía un ADNss desplazado en una horquilla (EJEMPLO 3, FIGURA 9). El marcado radiactivo del sustrato Exo-Sub en ambos extremos 5' y 3' permitió la detección de los dos fragmentos de ADN producidos por la actividad exonucleasa. Los dos fragmentos de ADN etiquetados, que procedían de la actividad exonucleasa, aparecían ambos en presencia y ausencia de los inhibidores de oligonucleótidos (no se muestran los datos), sin embargo, la cantidad de productos de corte generados en presencia de los inhibidores de oligonucleótidos era algo inferior a la producida en ausencia de los inhibidores, indicando que los inhibidores de oligonucleótidos ejercen cierto efecto inhibitorio sobre la actividad exonucleasa de los enzimas. Puesto que estos oligonucleótidos inhibían completamente las actividades polimerasa de los dos enzimas a 250 nM, su efecto sobre la actividad exonucleasa se considera marginal.

Inhibición de otras ADN polimerasas.

[0055] Los ensayos de inhibición usando otras polimerasas de ADN disponibles comercialmente y los ligandos TQ21 (SEC. Nº ID.: 59) y TQ30 (SEC. Nº ID.: 50) como inhibidores, se describen en el EJEMPLO 4. Se examinaron cuatro enzimas termoestables (la polimerasa Tbr de *Thermus brockianus*, la polimerasa Tfl de *Thermus flavus*, la polimerasa Tma de *Thermotoga maritima*, y la polimerasa Tli de *Thermococcus litoralis*); tres enzimas mesofílicas (fragmento Klenow de DNAP1 (KF) de *E. coli*, ADN polimerasa de T4 y ADN polimerasas de T7); y cuatro transcriptasas inversas (RT) (RT del VIH-I, RT del VMA (virus de la mieloblastosis aviaria) y RT del VLM-M (virus de la leucemia mística de Moloney), y su mutante que carece de actividad ARNasa H (SuperScript II).

[0056] De las seis polimerasas termoestables examinadas (incluyendo las polimerasas Taq y Tth), las cuatro polimerasas derivadas de especies de *Thermus* (Taq, Tth, Tbr y Tlf) fueron inhibidas por los dos oligonucleótidos seleccionados, sugiriendo que estos enzimas comparten un elevado grado de similitud. Tal y como se ha afirmado más arriba, se ha descrito que la polimerasa Tth y la polimerasa Taq son un 93% similares y un 88% idénticas a nivel de secuencia de aminoácidos (Abramson (1995) en "PCR Strategies" (Academic Press, Nueva York). La polimerasa Tfl se ha descrito que es un 93% similar y 86% idéntica a la polimerasa Taq a nivel de aminoácidos (D. Gelfand, comunicación personal). Por otro lado, la polimerasa Tma de *Thermotoga maritima* y la polimerasa Tli de *Thermococcus litoralis* no fueron inhibidas por ninguno de los ligandos. La polimerasa Tli comparte poca homología de secuencia con los enzimas de eubacterias (Ito y Braithwaite (1991) Nucleic Acids Res. 19:4045). Se ha descrito que la polimerasa Tma es un 61% similar y un 44% idéntica a la polimerasa Taq a nivel de aminoácidos (Abramson (1995) en "PCR Strategies" (Academic Press, Nueva York), aunque los ligandos de oligonucleótidos no inhiben la polimerasa.

[0057] De las cuatro transcriptasas inversas ensayadas, las RT del VIH-I y VMA (virus de la mieloblastosis aviaria) no se inhibieron. Por otra parte, la RT del VLM-M (virus de la leucemia m rda de moloney) y su mutante sin actividad RNasa H (SuperScript II) fueron inhibidas por los dos ligandos de oligonucleótidos.

[0058] Las ADN polimerasa mesofílicas, tales como el fragmento Klenow de la ADNPol de E. coli (KF), la ADNPol de T4 y la ADNPol de T7 no fueron inhibidas por ningún ligando a una concentración de 0,5 mM, a pesar de la similitud de los dominios polimerasa de la polimerasa Taq y del KF (Kim et al. (1995) Nature (London) 376:612; Lawyer et al. (1989) J. Biol. Chem. 264: 6427). Por tanto, parece que los inhibidores de oligonucleótidos son generalmente bastante específicos. Estos resultados son similares al comportamiento de los ligandos de ácido nucleico identificados mediante selección in vitro para otras transcriptasas inversas (Tuerk y MacDougal (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:6988; Chen y Gold (1994) Biochemistry 31:8746; Schneider et al. (1995) Biochemistry 34:9599).

Amplificación de un diana con un número bajo de copias.

[0059] El EJEMPLO 5 (FIGURA 10) describe un cierto número de amplificaciones de la PCR comparando las técnicas estándares de la PCR, la PCR "de arranque en caliente", y la PCR usando el TQ30 y TQ21 para facilitar la detección de una diana con un número bajo de copias mediante la PCR en ausencia de condiciones "de arranque en caliente". Se utilizó un sistema de cebador-plantilla diseñado para detectar un fragmento de ADN de 203-pares de bases (p.b.) procedente del LTR (repetic n terminal larga) del VIH-2, según describieron Respass et al. (1994) en Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 94:110. Las amplificaciones mediante la PCR se realizaron con 0, 10 y 50 copias de la diana del LTR del VIH-2. En condiciones de PCR normal, la identificación de la banda de diana correcta estuvo comprometida por la presencia de un cierto número de bandas no específicas (FIGURA 10A, carriles 1-3). La amplificación realizada en condiciones "de arranque en caliente" eliminó las bandas no específicas (FIGURA 10A, carriles 4-6). Los resultados de la amplificación realizada en presencia de una secuencia de ADNss de 78-nucleótidos no específica, que conten  secuencias fijas 5' y 3' idénticas que el TQ21 y TQ30 (FIGURA 10B, carriles 1-3) fueron similares a los obtenidos mediante la PCR sin usar condición "de arranque en caliente". Sin embargo, la adición tanto del TQ21 (FIGURA 10B, carriles 4-6) como del TQ30 (FIGURA 10B, carriles 7-9) llevada a cabo en condiciones estándares (sin "arranque en caliente") eliminó las bandas no específicas sin afectar al rendimiento de la banda específica de la diana. Fue de particular importancia la observación de que cuando el número de copia de la diana era bajo, la detección de la señal era muy eficiente (FIGURA 10B, comparar el carril con los carriles 5 y 8). El efecto de los inhibidores de oligonucleótidos fue similar cuando se usó la polimerasa Tth en lugar de la polimerasa Taq (no se muestran los datos) para detectar un número bajo de copias del LTR del VIH-2. El rendimiento potenciado de la banda específica de la diana obtenidos con los inhibidores de oligonucleótidos en la PCR incrementa la sensibilidad de la reacción, facilitando la detección de la diana presente con aproximadamente sólo 3 copias (FIGURA 10C).

[0060] Los inhibidores de oligonucleótidos usados en el experimento descrito en la FIGURA 10 no tenían protegidos sus extremos 3', permitiendo potencialmente que iniciaran la amplificación de forma no específica, y complicando aún más el resultado de la PCR. Sin embargo, no se detectaron bandas adventicias, lo que sugiere que en este sistema, el recubrimiento 3' de los inhibidores de oligonucleótidos no era necesario para eliminar la generación de bandas no específicas.

Identificación de ligandos truncados del TQ30 y TQ21 con actividad inhibidora.

[0061] Típicamente, no todos los nucleótidos en una secuencia de longitud completa son necesarios para su función. Por tanto, es deseable la identificación de secuencias de ADN truncadas que retienen la función de la secuencia completa. Para los experimentos de truncación se escogieron los ligandos TQ30 (SEC. N  ID.: 50) de la Familia I y TQ21 (SEC. N  ID.: 59) de la Familia II (consultar TABLA 4). Las selecciones por afinidad de fragmentos anillados con extremo etiquetado generados a partir de las secuencias de longitud completa de ambos ligandos, seguidas por el análisis en gel de secuenciación, según se describe en el EJEMPLO 2, no proporcionó límites identificables. Por tanto, los dos ligandos se sometieron a análisis de supresión. Las formas suprimidas secuencialmente se ensayaron en función de su capacidad para inhibir las polimerasas en el ensayo de extensión de la horquilla, para identificar truncaciones funcionales.

Truncaciones del ligando TQ30 (SEC. N  ID.: 50).

[0062] La región variable de 30 nucleótidos del TQ30, que conten  el motivo de secuencia conservado con la estructura de tallo-bucle predicha (Trnc.A-30 (SEC. N  ID.: 74); TABLA 5) inhibe la polimerasa Taq a 25 C con el mismo alcance que la secuencia de longitud completa (no se muestran los datos). No obstante, a temperaturas más elevadas la eficacia de la inhibición es menor que la de la secuencia de longitud completa. A 30 C, por ejemplo, la

inhibición de la polimerasa Taq por el Trnc.A-30 (250 nM) es aproximadamente del 82%, mientras que la secuencia de longitud completa inhibió totalmente el enzima a esta temperatura y concentración. La sensibilidad térmica incrementada del Trnc.A-30 puede deberse a la presencia de un hélice interrumpida con pares de bases A-T, una hélice propensa a fundirse a una temperatura baja.

[0063] En consecuencia, se diseñaron tres variantes de tallo-bucle del Trnc.A-30, las cuales contenían tallos no interrumpidos con elevada proporción de pares de bases G-C. En estas variantes, el motivo de secuencia conservado identificado en la Familia I estaba inalterado (TABLA 5), pero los tallos tenían varias longitudes. A una concentración de inhibidor de 250 nM, el Trnc.1-30 (SEC. N° ID.: 67) y el Trnc.2-30 (SEC. N° ID.: 68) inhibieron aproximadamente el 95% de la actividad de la polimerasa Taq, mientras que el Trnc.3-30 (SEC. N° ID.: 69) inhibió sólo aproximadamente el 60% de la actividad polimerasa (ver más abajo). El Trnc.3-30 que contenía el tallo más corto (7 pares de bases) de las tres variantes era un inhibidor pobre para la polimerasa Taq, indicando que se requieren contactos adicionales en el tallo para una interacción productiva. Para determinar si la inhibición disminuida observada con el Trnc.3-30 se debe a su afinidad reducida por la unión a la polimerasa, se calcularon las afinidades de las tres variantes por su unión a la polimerasa Taq. Los valores de K_d se hallan en el rango 2-3 nM (TABLA 5), indicando que las tres variantes tenían afinidades similares. Por tanto, la ausencia de inhibición causada por el Trnc.3-30 no se debe a la ausencia de unión, sino presumiblemente a su incapacidad para bloquear el sitio activo. Las afinidades de las tres variantes por la unión a la polimerasa Taq son aproximadamente 75 veces inferiores a las de la molécula de longitud completa (la K_d de la secuencia de longitud completa es 40 pM), y aproximadamente 3-5-veces inferior a la del Trnc.A-30. Los valores de IC_{50} de las tres construcciones disminuyeron con la disminución en la longitud del tallo; 25, 50 y 186 nM respectivamente para el Trnc.1-30, Trnc.2-30 y Trnc.3-30. Este resultado está de acuerdo con la noción de que los ligandos con tallos más largos son inhibidores más efectivos. El valor de IC_{50} de la secuencia de longitud completa es 22 nM. Los ensayos de extensión de horquilla se realizaron a 30°C durante 1 hora.

[0064] Aunque el TQ30 de longitud completa inhibe la polimerasa Tth, ni el Trnc.1-30 ni el Trnc.2-30 inhiben la polimerasa Tth, a pesar del hecho de que el enzima es completamente inhibido por el ligando de longitud completa.

[0065] El fragmento Stoffel (61 kD) es una forma truncada de la polimerasa Taq que carece de actividad exonucleasa 5'-3' y es similar a la ADN polimerasa KlenTaq de 67 kD (67 kD). La actividad polimerasa del fragmento Stoffel fue inhibida completamente por el TQ30 de longitud completa, así como por los tres formas truncadas. Los valores IC_{50} de las tres formas truncadas son, Trnc. 1-30 = 2,7 nM, Trnc.2-30 = 5,9 nM y Trnc.3-30 = 10,3 nM (FIGURA 12). En conjunto, las tres formas truncadas del TQ30 son más efectivas inhibiendo el fragmento Stoffel que la polimerasa Taq (comparar la FIGURA 11 con la FIGURA 12). Los valores de IC_{50} de estas formas truncadas para la inhibición del fragmento Stoffel son un orden de magnitud mejores que los de la polimerasa Taq. El valor de IT_{50} para la inhibición del fragmento Stoffel por parte del Trnc.2-30 fue 38°C (no se muestran los datos). Sorprendentemente, la secuencia TQ21, que inhibe tanto la polimerasa Taq como la Tth, no inhibe el fragmento Stoffel. Esto sugiere que el sitio de unión del TQ21 sobre el fragmento Stoffel está, bien parcialmente o completamente suprimido, o ha sido reorganizado a partir de la truncación de la proteína.

Truncaciones del ligando TQ21 (SEC. N° ID.: 59).

[0066] A diferencia de los ligandos de la Familia I, tales como el TQ30, la región variable de 30-nucleótidos del ligando de la Familia II, TQ21, no inhibe ni la polimerasa Taq ni la Tth (no se muestran los datos), indicando que los nucleótidos adicionales de las regiones fijas son necesarios para la inhibición. El análisis de supresión de la secuencia TQ21 de longitud completa condujo a la identificación de una secuencia de 51-meros (Trnc.21 (SEC. N° ID.: 70) (TABLA 4)) que retuvo la capacidad de inhibir tanto la polimerasa Taq como la Tth. Además de la región aleatoria de 30-nucleótidos completa, la secuencia del Trnc.21 contenía 9 y 12 nucleótidos a partir respectivamente de las regiones fijas 5' y 3' (TABLA 4). En contraste con las formas truncadas del TQ30, las cuales mostraban una afinidad disminuida por la polimerasa Taq, el Trnc.21 mostró una afinidad incrementada; la K_d del Trnc.21 por la unión a la polimerasa Taq es de 9 pM (FIGURA 13A), una afinidad aproximadamente 4 veces mayor que la de la secuencia de longitud completa. El valor de IC_{50} del Trnc.21 para la inhibición de la polimerasa Taq es de 21 nM (FIGURA 13B), aproximadamente 3 veces inferior al valor para la secuencia de longitud completa. Los valores de IT_{50} calculados para la polimerasa Taq y la polimerasa Tth son respectivamente 34°C y 35,6°C (FIGURA 13C). Los ensayos de extensión de la horquilla se realizaron entre las temperaturas de 35 y 50°C durante 1 hora con Trnc.21 250 mM. Por tanto, en base a la afinidad y a los valores de IC_{50} e IT_{50} , la forma truncada del TQ21 es un inhibidor mejora que la secuencia de longitud completa. De forma similar a la secuencia de longitud completa, el Trnc.21 no inhibió la actividad del fragmento Stoffel.

Formas diméricas de los ligandos truncados.

[0067] La multimerización de ligandos incrementa la concentración local efectiva, resultando en un mayor

tiempo de residencia con la diana (avidez). En base a su moderada afinidad por la polimerasa Taq, se seleccionó el Trnc.2-30 para la síntesis de un homodímero (TABLA 4). El homodímero (D.30-D.30) (SEC. N° ID.: 71) (TABLA 4) de Trnc.2-30 se sintetizó en una orientación cola-con-cola (unido en los extremos 3') usando el dímeros simétrico CPG como soporte en una síntesis química en fase sólida usando procedimientos estándares.

[0068] La afinidad del dímero D.30-D.30 por la unión a la polimerasa Taq es de 40 pM (FIGURA 14A), aproximadamente 75-veces superior a su forma monomérica. El valor de IC_{50} del homodímeros es de 14 nM, aproximadamente 3,5 veces inferior al de la forma monomérica (FIGURA 14B). Por tanto, la dimerización del TQ30 truncado produjo un inhibidor más efectivo de la polimerasa Taq.

[0069] También se prepararon dos secuencias heterodiméricas en las que dos formas monoméricas truncadas, el Trnc.2-30 y el Trnc-21 (TABLA 4), se unieron mediante un engarce que contenía 3 timinas. En D.21-D.30 (SEC. N° ID.: 72) la secuencia Trnc-21 se colocó en el extremo 5' de la molécula, mientras que en D.30-D.21 (SEC. N° ID.: 73) ocupa el extremo 3' de la molécula. A diferencia del TQ30 de longitud completa, sus formas truncadas no inhiben la polimerasa Tth. El Trnc-2, por otra parte, inhibió ambas polimerasas Taq y Tth, pero no el fragmento Stoffel. Asumiendo que las unidades monoméricas son capaces de funcionar independientemente, después de ser atadas en una única secuencia, la combinación de los dos ligandos truncados proporcionará una única secuencia que puede inhibir las tres polimerasas. A la concentración de inhibidor más baja (62,5 nM) el efecto inhibitorio de los dos heterodímeros sobre la polimerasa Taq es mayor que el de los dos monómeros. El efecto de los heterodímeros sobre la polimerasa Tth es idéntico al del monómero Trnc-21. El fragmento Stoffel no pudo extender completamente la plantilla en horquilla en presencia de los dos heterodímeros. En contraste, los productos parcialmente extendidos fueron menos abundantes en presencia de la secuencia Trnc.2-30 monomérica. La ausencia de la extensión completa de la plantilla en horquilla sugiere que los heterodímeros no suprimen la actividad del fragmento Stoffel.

[0070] El heterodímero D.21-D.30 tiene un valor de IC_{50} de aproximadamente 30 nM para la inhibición de las polimerasas Taq y Tth (FIGURA 15A). Los valores de IT_{50} para la inhibición de las polimerasas Taq y Tth son respectivamente 41°C y 34,5°C (FIGURA 15B). El D.21-D.30 inhibe el fragmento Stoffel con un valor de IC_{50} de 15,5 nM y un valor de IT_{50} de 38°C (no se muestran los datos). La K_d del heterodímero D.21-D.30 ligando para la polimerasa Taq es similar al del Trnc-21 (10 pM), lo que sugiere que la proteína preferentemente se une al motivo de secuencia con una elevada afinidad de unión.

[0071] La ubicación de las dos unidades monoméricas en el dímero parece no tener un efecto global sobre la inhibición de ninguna de las tres polimerasas. Las dos unidades monoméricas diferentes no muestran un efecto perjudicial cuando se combinan en un dímero. Como se esperaba, los heterodímeros mostraron la capacidad de inhibir las tres polimerasas de forma bastante efectiva, indicando que, en general, las funciones de las unidades monoméricas en los heterodímeros son mutuamente excluyentes.

[0072] Los ejemplos siguientes se proporcionan para explicar e ilustrar la presente invención y no se pretende que sean limitantes de la invención.

Ejemplo 1. Procedimientos experimentales

A. Materiales y Procedimientos.

[0073] La polimerasa Taq recombinante (rTaq; Mr 94 kDa) suspendida en un tampón consistente en KCl 100 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), EDTA 0,1 mM, 50% de glicerol (v/v) y 0,2% de Tween 20, y la polimerasa Tth recombinante (rTth Mr 94 kDa) suspendida en un tampón consistente en Bicine-KOH 50 mM (pH 8,3), KCl 90 mM y 50% de glicerol (v/v) se compraron a Roche Molecular Systems, Inc. (Alameda, CA). Las ADN polimerasas Taq, Tth y UITma se obtuvieron de Perkin Elmer. La polimerasa Ultma es una forma suprimida de la polimerasa Tma que carece de la actividad exonucleasa 5'-3' del tipo salvaje. Las ADN polimerasas Tli y Tfl se compraron a Promega. La polimerasa Tbr (Thermalase Tbr) se obtuvo de Amresco Inc. Los fosforamiditos CPG de engarce 3'-3' con ramificación simétrica y C-6 Thiolmodifier se obtuvieron de Clontech (Palo Alto, CA). Las cuentas de yodoacetilo ULTRALINK™ se compraron a Pierce Chemicals (Rockford, IL). Los enzimas usados en el marcado radiactivo del ADN se obtuvieron de Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). Todos los otros reactivos y compuestos químicos eran de grado analítico y se compraron a fuentes comerciales estándares.

Preparación de oligonucleótidos.

[0074] Los oligonucleótidos se sintetizaron mediante la química de cianoetil-fosforamidito en fase sólida estándar, y se purificaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante para homogeneizarlos en tamaño antes de usarlos. El homodímero simétrico se sintetizó con CPG de engarce 3'-3' de ramificación simétrica. La concentración de ADN se basó en 33 µg/mL = 1 unidad de A_{260} .

Preparación de cuentas de afinidad.

[0075] Veinticinco nanomoles del ligando TQ21 (SEC. N° ID.: 59) o TQ30 (SEC. N° ID.: 50) (TABLA 3) que contenían un grupo tiol en el extremo 5' se desprotegeron con AgNO_3 y ditioneitol (DTT) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El exceso de DTT se eliminó mediante cuatro extracciones secuenciales con volúmenes iguales de acetato de etilo. El ligando desprotegido se mezcló a continuación con 500 μL de cuentas de yodoacetilo ULTRALIN™ que se habían lavado dos veces en un tampón consistente en Tris-HCl 50 mM (pH 8,3) y EDTA 5 mM. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas sobre una plataforma rotatoria. Los sitios sin reaccionar sobre las cuentas de yodoacetilo se recubrieron haciendo reaccionar la mezcla con 50 μL de una solución de cisteína 0,5 M en el mismo tampón durante 15 minutos. Las cuentas de control se prepararon haciendo reaccionar 500 μL de cuentas de yodoacetilo con 500 μL de cisteína 0,5 M. Después de la reacción, las cuentas se lavaron cinco veces con 500 μL de un tampón de PCR consistente en heparina 75 μM , MgCl_2 12,5 mM, KCl 50 mM y Tris-HCl 10 mM (pH 8,3).

B. SELEX.

[0076] El procedimiento SELEX se ha descrito con detalle en la patente estadounidense n° 5.270.163. Los experimentos SELEX con ambas polimerasas se realizaron usando la plantilla y los cebadores mostrados en la TABLA 1. La selección con la polimerasa Taq se llevó a cabo a temperatura ambiente en un tampón consistente en Tris-HCl 10 mM (pH 8,3; a 22°C), KCl 50 mM y MgCl_2 2,5 mM (tampón unidor para Taq). La selección con la polimerasa Tth se llevó a cabo en un tampón que contenía Bicina-KOH 50 mM (pH 8,3; a 25°C), KCl 90 mM y $\text{Mn}(\text{OAc})_2$ 3,5 mM (tampón unidor para Tth).

[0077] Cada experimento SELEX se inició con 5 nmol de ADN de hebra simple (ADNss) sintético, purificado en gel, del grupo de secuencia aleatoria, consistente en una región aleatoria de 30 nucleótidos, flanqueada por regiones 5' y 3' de estructura fija (TABLA 1). En una ronda de selección típica, el ADNss suspendido en el tampón de unión apropiado se calentó a 90°C durante 3 minutos, se enfrió sobre hielo, y a continuación se llevó a temperatura ambiente. Una vez equilibrado a temperatura ambiente, el ADN se incubó durante 15 minutos con la polimerasa diana apropiada, en presencia de 2 nmol de ARNt como un competidor y albúmina de suero bovino al 0,01% (hSA). Los complejos de polimerasa-ADN se separaron del ADN no unido mediante filtración en nitrocelulosa a través de un filtro de nitrocelulosa prehumedecido (0,45 μM , Millipore) bajo succión. El filtro se lavó inmediatamente con 20 mL del tampón de unión, 20 mL de urea 0,5 M en el tampón unidor, y urea 0,5 M en agua. El ADN retenido en el filtro se eluyó y aisló mediante precipitación con etanol en presencia de ARNt portador (5 μg).

[0078] El ADN aislado se amplificó mediante la PCR con el Equipo Cebador I (TABLA 1). Una de las hebras cebadoras contenía tres biotinas contiguas en el extremo 5'. La hebra no biotinilada del ADN dúplex resultante se aisló mediante electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes (Pagratis et al., en preparación) y se usó en la siguiente ronda de selección. En las rondas subsiguientes, antes de incubarlos con la polimerasa diana, los grupos de ADN se pasaron a través de filtros de nitrocelulosa (contraselección) para eliminar secuencias de ADN que se unieran al filtro de nitrocelulosa. El número de picomoles de polimerasa diana se disminuyó gradualmente durante el curso de la SELEX para incrementar la presión selectiva en busca de secuencias con elevada afinidad de unión. La cantidad de ADN en cada selección se mantuvo al menos cinco veces superior a la cantidad de proteína para garantizar la competición en busca de secuencias de ADN con elevada afinidad de unión.

[0079] El progreso de la SELEX se monitorizó mediante análisis de unión al filtro de nitrocelulosa de los grupos enriquecidos. Los grupos enriquecidos que mostraban la afinidad de unión más elevada se amplificaron mediante PCR con el Equipo de Cebadores II para incorporar sitios de restricción BamHI y EcoRI en los extremos del ADN dúplex resultante. Este ADN se purificó en gel y se digirió con BamHI y EcoRI, y se clonó en el vector plasmídico pUC18 previamente digerido con los mismos enzimas usando técnicas estándares. (Sambrook et al. (1989), en "Molecular Cloning: A laboratory Manual," 2ª ed., Parte 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Los clones se aislaron y secuenciaron mediante la técnica de secuenciación dideoxi estándar (equipo Sequenase de U.S. Biochemical, Cleveland, OH).

C. Ensayo de unión a filtro de nitrocelulosa.

[0080] Para aislar las moléculas de ADN que se unen con fuerza respectivamente a la polimerasa Taq y a la polimerasa Tth, se usó el procedimiento de reparto del filtro de nitrocelulosa tal y como se utiliza en la solicitud de patente de la SELEX. De forma resumida, los grupos de ^{32}P -ADNss purificados en gel se suspendieron en el tampón de unión, se calentaron hasta 80°C, se enfriaron sobre hielo, y a continuación se llevaron a temperatura ambiente. El ADN (5-10 pM) se incubó a continuación durante 15 minutos a temperatura ambiente, con distintas cantidades de la polimerasa diana, en 50 μL del tampón de unión apropiado, el cual contenía 0,1 μg de ARNt y un 0,01% de hSA. La

concentración de ADN se mantuvo más baja que 100 pM para garantizar el equilibrio en presencia de concentraciones de proteína en exceso. Transcurridos 15 minutos las mezclas de reacción se pasaron a través de filtros de matriz mixta nitrocelulosa/acetato de celulosa previamente humedecidos (0,45 mm de tamaño de poro, Millipore Corporation, Bedford, MA) y los filtros se lavaron inmediatamente con 5 mL de tampón de unión. La cantidad de ADN unida a los filtros se cuantificó midiendo la radiactividad de los filtros mediante recuento de centelleo en líquido. La cantidad de ADN unido a los filtros en ausencia de proteína se usó para la corrección de fondo. El porcentaje de ADN de entrada retenido sobre cada filtro se representó frente al log de la correspondiente concentración de polimerasa (FIGURAS 1 y 2). Para obtener las constantes de disociación (K_d) de los ligandos de AND respectivamente para las polimerasas Taq y Tth se usó el procedimiento no lineal de los mínimos cuadrados. (Schneider et al. (1995) *Biochemistry* 34:9599; 40 Jellinek et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 90:11227-11231).

[0081] El grupo de secuencia aleatoria no seleccionada se une a la polimerasa Tth con una K_d estimada de aproximadamente 70 nM (FIGURA 1B, (•)), mientras que la K_d de la unión de este grupo a la polimerasa Taq es aproximadamente de 50-100 nM (FIGURA 1A, (○)). Después de 12 rondas de selección, la K_d de unión a la polimerasa Taq fue de 3,5 nM (FIGURA 1A, (○)). Rondas adicionales de selección no resultaron en una mejora adicional de la afinidad. Por tanto, la afinidad resultante del grupo enriquecido por la polimerasa Taq se mejoró significativamente en comparación con el grupo aleatorio no seleccionado. Se obtuvieron resultados similares con la polimerasa Tth, en donde el grupo procedente de la 10ª ronda mostró una K_d de 5 nM (FIGURA 1B, (○)).

[0082] El grupo del ADNss seleccionado para la polimerasa Taq mostró una unión muy estrecha a la polimerasa Tth con una K_d de 0,2 nM (FIGURA 2A, (○)). Este resultado no es sorprendente, puesto que la identidad de secuencia de aminoácidos entre las dos polimerasas es aproximadamente del 87% (Asakura et al. (1993) *J. Ferment. Bioeng.* 76:265-269). El grupo seleccionado para la unión a la polimerasa Tth unió la polimerasa Taq de manera diferente, con la saturación de la unión alrededor del nivel del 50% (FIGURA 2B, (○)), sugiriendo que aproximadamente la mitad de las secuencias en el grupo no están interaccionando con la polimerasa Taq. En base al 50% de saturación, la K_d estimada es de 0,3 nM.

[0083] En la TABLA 2 se detallan las secuencias de ADNss obtenidas de 10 rondas de selección realizadas con la polimerasa Tth. Se secuenciaron veintinueve clones individuales procedentes de la selección con polimerasa Tth (sólo la región variable de 30-nucleótidos se muestra en la TABLA 2). Las secuencias se agruparon en dos familias en base a la similitud de secuencia. Las secuencias de ADNss obtenidas de 12 rondas de selección realizadas con la polimerasa Taq se detallan en la TABLA 3. Se aislaron treinta y tres secuencias únicas. Las letras minúsculas en algunas de las secuencias indican la secuencia 5' fija y las letras mayúsculas ilustran la región aleatoria de 30 nucleótidos. Las secuencias se agruparon en tres familias en base a la similitud de secuencia.

Ejemplo 2. Ensayos de inhibición de polimerasa

[0084] Los ensayos de inhibición de polimerasa se realizaron usando el ADN plantilla (DNA-HP; 5'-ATGCCTAAGT TTCGAACGCG GCTAGCCAGC TTTTGCTGGC TAGCCGCGT-3' (SEC. N° ID.: 6)), marcada en el extremo 5' con la quinasa de polinucleótidos del T4 y 32 P-γ-ATP, y se purificaron mediante electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes (FIGURA 4). En un procedimiento experimental representativo, 0,25 pmoles de polimerasa Taq (5 U) o 0,125 pmoles (2,5 U) de polimerasa Tth se mezclaron con 5 pmoles (250 nM) del grupo enriquecido, del grupo aleatorio, o con un ligando de ADN específico, en el tampón estándar de la PCR (20 μL). Se añadieron cinco pmoles (250 nM) de DNA-HP plantilla marcado, y la mezcla se incubó a diferentes temperaturas durante un determinado período de tiempo. La reacción se detuvo añadiendo EDTA hasta una concentración final de 125 mM (5 μL de EDTA 0,5 M). El ADN se resolvió sobre un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Los geles se visualizaron mediante autorradiografía, y el porcentaje de ADN unido se cuantificó mediante PhosphorImager. Las variaciones en este procedimiento general para reacción específicas se mencionan en memoria.

[0085] El orden en el que se añaden los inhibidores de oligonucleótidos a la mezcla de reacción es irrelevante con tal que la plantilla se añada en último lugar. Los oligonucleótidos requieren iones Mg^{++} , un componente esencial de la PCR, para funcionar, y parecen tolerar muchos sistemas de tampón.

[0086] La FIGURA 5 ilustra los resultados de los ensayos de actividad polimerasa usando los grupos de ADN enriquecidos. Las FIGURAS 6-9 ilustran los resultados de los ensayos de actividad polimerasa usando los ligandos TQ30 (SEC. N° ID.: 50) y TQ21 (SEC. N° ID.: 59).

Medición de los valores de IC_{50} .

[0087] Los valores de IC_{50} (la concentración de inhibidor necesaria para producir el 50% del producto en el

ensayo) se obtuvieron usando el ensayo de extensión de la horquilla. En un ensayo de inhibición típica, una reacción de 20 µL contenía 0,25 pmoles de polimerasa Taq (5 U) ó 0,125 pmoles de polimerasa Tth (2,5 U), el inhibidor de oligonucleótidos (a diferentes concentraciones), Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM, y 1 mM de cada dNTP. El sustrato de ADN en horquilla con el extremo 5' marcado (DNA-HP; 5'-ATGCCTAAGT TTCGAACGCG GCT AGCCAGC TTTTGCTGGC TAGCCGCGT-3') se añadió a continuación hasta una concentración final de 250 nM, y la reacción se incubó a 30°C durante 1 hora. La reacción se detuvo añadiendo 5 µL de EDTA 0,5 M (pH 8.0) seguidos por tampón de carga en gel de formamida. Los productos de la extensión se resolvieron sobre geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes. La cantidad de productos de extensión se cuantificó mediante PhosphorImager. Las cantidades de productos formados en presencia de inhibidor se normalizó respecto el producto formado en ausencia de un inhibidor para obtener el porcentaje de producto.

Medición de los valores de IT₅₀.

[0088] Las reacciones de extensión de la horquilla fueron las mismas que las descritas arriba, excepto que la concentración de inhibidor era 250 nM. El tiempo de incubación a cada temperatura era de 1 hora. La cantidad de producto se cuantificó mediante PhosphorImager, y se normalizó respecto el producto formado en ausencia de un inhibidor a la misma temperatura para obtener el porcentaje de producto.

Determinación de la actividad de sustrato del ligando TQ30 y del ligando TQ21.

[0089] En un procedimiento experimental representativo, se incubó ligando TQ30 (SEC. N° ID.: 50), TQ21 ó TQ21 (recubierto en 3' con un engarce de etilenglicol) (aproximadamente 3 pmoles) marcado en el extremo 5', en 20 µL del tampón de unión y 1 mM de cada dNTP, en ausencia y presencia de 5 U de polimerasa Taq o 2,5 U de polimerasa Tth, durante 16 horas a temperatura ambiente. El recubrimiento del extremo 3' del TQ21 se realizó con un engarce de etilenglicol ("3'-Spacer C3" de Glen Research) usando condiciones estándares conocidas en el estado de la técnica.

Ensayos de Captura por Afinidad.

[0090] Las reacciones de captura por afinidad se realizaron a 70°C durante 5 minutos en un volumen de reacción de 100 µL que contenía: heparina 75 µM, MgCl₂ 12,5 mM, 1 mM de cada dNTP, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), 5 U de polimerasa Taq ó 2,5 U de polimerasa Tth, y plantilla de ensayo en horquilla con el extremo 5' marcado (DNA-HP) 250 nM. Transcurridos 5 minutos la mezcla de reacción se diluyó tres veces y se enfrió a 4°C. Después de 1 ronda de síntesis, se añadieron 15 µL de cuentas (bien cuentas de afinidad o cuentas control, preparadas tal y como se describió más arriba) a la mezcla de reacción a 4°C y se mezclaron con delicadeza durante 10 minutos. Los sobrenadantes que contenían la plantilla marcada se retiraron después de la centrifugación y se guardaron para su análisis en gel. Las cuentas se lavaron cinco veces con 100 µL de un tampón consistente en heparina 75 µM, MgCl₂ 12,5 mM, KCl 50 mM y Tris-HCl 10 mM (pH 8,3). Después de 2 rondas de síntesis, las cuentas lavadas se mezclaron con una alícuota reciente de la mezcla de reacción que contenía la totalidad de los reactivos excepto la polimerasa. Después de incubarla a 70°C durante 5 minutos, la mezcla de reacción se recuperó y analizó mediante electroforesis en gel.

Ejemplo 3. Ensayo de inhibición de la exonucleasa

[0091] Los ensayos de inhibición de exonucleasas se realizaron usando la plantilla diseñada, 5'-TTCGAGCGTG AATCTGAATT CGCGGCTAGC CAGCTTTTGC TGGCTAGCCG CGGTGGGAAA CTGAGGTAGG TGTTTTCACC TACCTCAG TTTCCCACC-3' (Exo-sub) (SEC. N° ID.: 75), marcada en el extremo 5' (usando [γ ³²P]-ATP y la quinasa de polinucleótido de T4) y en el extremo 3' usando ([α ³²P]-ddATP y desoxiterminal transferasa). En un procedimiento experimental representativo, 5 U de la polimerasa Taq ó 2,5 U de la polimerasa Tth se mezclaron con 250 nM de ligando TQ30 o ligando TQ21 en el tampón de PCR estándar (20 µL), seguidos por la adición del Exo-Sub doblemente marcados (250 nM, añadido en último lugar). Después de incubarlas durante 16 horas a temperatura ambiente, las reacciones se apagaron mediante la adición de EDTA hasta una concentración final de 0,1 mM. Los productos del corte se resolvieron sobre geles de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturizantes.

Ejemplo 4. Ensayos de inhibición de polimerasa

[0092] La inhibición mediante el TQ21 (SEC. N° ID.: 50) y el TQ30 (SEC. N° ID.: 50) se ensayó con (A) polimerasas de ADN termofílicas, (B) ADNP mesofílicas (polimerasa Taq como control), y transcriptasas inversas, y (C) RT. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20 µL con la plantilla en horquilla HP (EJEMPLO 2) en presencia de 1 mM de cada dNTP, usando 250 ó 500 nM de ligando TQ21 o TQ30. Las condiciones de reacción específicas para cada polimerasa fueron como sigue:

Polimerasas termostables: polimerasa Tma: polimerasa UITma (6 U), Tris-HCl 10 mM, pH 8,8, 10 mM KCl, MgCl₂ 2,5 mM y 0,002% Tween 20 (v/v); polimerasa Tbr (2 U), Tris-HCl 10 mM, pH 8,8, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM y 0,01% de Triton X-100; polimerasa Tli (3 U) y polimerasa Tfl (5 U), Tris-HCl 10 mM; pH 9,0, KCl 50 mM y 0,1% de Triton X-100.

Polimerasas mesofilicas: Todas las incubaciones incluyendo la polimerasa Taq (5 U) (un control interno para el tampón) se realizaron en un tampón consistente en Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, KCl 40 mM, MgCl₂ 5 mM, y DTT 7,5 mM (fragmento Klenow (5 U); ADN polimerasa de T4 (4 U); ADN polimerasa de T7 (7 U).

Transcriptasas inversas. Todas las incubaciones se realizaron en un tampón consistente en Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, NaCl 60 mM, Mg(OAc)₂ 6 mM, y DTT 10 mM. (RT de VIH-1 (0,56 pmoles); RT de VMA (1 U); RT de VML-M (10 U); Superscript II (Ssript II) (10 U).

Ejemplo 5. Detección de una diana con un número bajo de copias.

[0093] Las amplificaciones con PCR se realizaron usando un sistema que amplifica un producto de 203-p.b. específico para la diana, procedente de la LTR 2 del VIH-35, según describieron Respass et al. (1994) en Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 94:110). Todas las amplificaciones con PCR se llevaron a cabo en presencia de 1,3 µg de ADN placentario humano, 0,4 mM de cada dNTP, 25 pmoles de cada cebador, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 2,5 mM, 10% de glicerol, 5 U de polimerasa Taq y la plantilla (el número aproximado de copias se indica en las FIGURAS 10A-10C) en 100 µL de volumen de reacción. El termociclado se realizó a 50°C durante 2 minutos, seguido por 94°C durante 30 segundos; 60°C durante 30 segundos; 72°C durante 30 segundos, y a continuación una hibridación autoextendida a 60°C en incrementos de 1°C durante 5 ciclos. Esto siguió una amplificación de 35 ciclos a 90°C durante 30 segundos; 65°C durante 30 segundos; 72°C durante 30 segundos.

[0094] La PCR "de arranque en caliente" se realizó usando cuentas "AmpliWax" (de Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las otras amplificaciones con PCR se realizaron sin condiciones "de arranque en caliente".

[0095] La PCR "NeXstart" se realizó usando los ligandos TQ30 y TQ21 (concentración final 50 nM) como inhibidores. Una amplificación se realizó en presencia de un oligonucleótido no específico (concentración final 50 nM) con propósito de comparación.

[0096] Los siguientes párrafos numerados contienen Iso enunciados de las combinaciones amplias de las características técnicas inventivas descritas en la presente invención.

1. Un método de identificación de ligandos de ácido nucleico para una polimerasa, que comprende:

a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos;

b) poner en contacto la mezcla candidata de ácidos nucleicos con dicha polimerasa, donde los ácidos nucleicos que tienen una mayor afinidad por la polimerasa en relación con la mezcla candidata se pueden separar del resto de la mezcla candidata;

c) separar los ácidos nucleicos de mayor afinidad del resto de la mezcla candidata; y

d) amplificar los ácidos nucleicos de mayor afinidad para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácidos nucleicos con una afinidad y especificidad relativamente superior para la unión a la polimerasa, mediante lo cual se pueden identificar los ligandos de ácido nucleico de la polimerasa.

2. El método del párrafo 1, que comprende además:

e) repetir las etapas b), c) y d).

3. El método del párrafo 1, en el que dicha polimerasa es una ADN polimerasa.

4. El método del párrafo 1, en el que dicha polimerasa es una transcriptasa inversa.

5. El método del párrafo 1, en el que dicha polimerasa es termoestable.

6. El método del párrafo 3, en el que dicha ADN polimerasa se aísla de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa).

7. El método de los párrafos 3 ó 4, en el que dicha polimerasa se aísla de *Thermus thermophilus* (Tth polimerasa).

8. El método del párrafo 1, en el que dicha mezcla candidata de ácidos nucleicos está comprendida de ácidos nucleicos de cadena sencilla.

9. El método del párrafo 1, en el que dichos ácidos nucleicos de cadena sencilla son ácidos desoxirribonucleicos.

10. Un método para inhibir la actividad de una ADN polimerasa, que comprende añadir una cantidad eficaz de un ligando de ácido nucleico de ADN polimerasa de afinidad elevada a una reacción de polimerización de ADN que se mantiene a temperaturas ambientales.

11. El método del párrafo 10, en el que dicho ligando de ácido nucleico de ADN polimerasa se identifica según el método del párrafo 1.

12. El método del párrafo 10, en el que dicha ADN polimerasa es Taq polimerasa.

13. El método del párrafo 12, en el que dicho ligando de polimerasa es un ADN seleccionado entre uno de los ligandos

de la Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74).

14. El método del párrafo 10, en el que dicha ADN polimerasa es Tth polimerasa.

15. El método del párrafo 14, en el que dicho ligando de polimerasa es un ADN seleccionado de uno de los ligandos de Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74).

16. Un ligando de ácido nucleico no natural purificado y aislado para una polimerasa.

17. El ligando de ácido nucleico del párrafo 16 identificado según el método del párrafo 1.

18. El ligando de ácido nucleico no natural purificado y aislado del párrafo 16, en el que dicha polimerasa es Taq polimerasa y en el que dicho ligando se selecciona del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes de secuencias complementarias de las mismas.

19. El ligando de ácido nucleico no natural purificado y aislado del párrafo 16, en el que dicha polimerasa es Taq polimerasa y en el que dicho ligando es un ADN sustancialmente homólogo a la Taq polimerasa y tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse a la misma que un ligando seleccionado del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes de secuencias complementarias de las mismas.

20. El ligando de ácido nucleico no natural purificado y aislado del párrafo 16, en el que dicha polimerasa es Taq polimerasa y en el que dicho ligando de ácido nucleico tiene sustancialmente la misma estructura y sustancialmente la misma capacidad de unirse a Taq polimerasa que un ligando seleccionado del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes de secuencias complementarias de las mismas.

21. El ligando de ácido nucleico no natural purificado y aislado del párrafo 16, en el que dicha polimerasa es Tth polimerasa y en el que dicho ligando de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes de secuencias complementarias de las mismas.

22. El ligando de ácido nucleico no natural purificado y aislado del párrafo 16, en el que dicha polimerasa es Tth polimerasa y en el que dicho ligando de ácido nucleico es sustancialmente homólogo a la Tth polimerasa y tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse a la misma que un ligando seleccionado del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes de secuencias complementarias de las mismas.

23. El ligando de ácido nucleico no natural purificado y aislado del párrafo 16, en el que dicha polimerasa es Tth polimerasa y en el que dicho ligando de ácido nucleico tiene sustancialmente la misma estructura y sustancialmente la misma capacidad de unirse a Tth polimerasa que un ligando seleccionado del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes de secuencias complementarias de las mismas.

24. Un ligando de ácido nucleico no natural purificado y aislado para una transcriptasa inversa.

25. El ligando de ácido nucleico para la transcriptasa inversa del párrafo 24 identificado según el método que comprende:

40 a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos;
b) poner en contacto la mezcla candidata de ácidos nucleicos con la transcriptasa inversa, donde los ácidos nucleicos que tienen una mayor afinidad por la transcriptasa inversa en relación con la mezcla candidata se pueden separar del resto de la mezcla candidata;

45 c) separar los ácidos nucleicos de mayor afinidad del resto de la mezcla candidata; y
d) amplificar los ácidos nucleicos de mayor afinidad para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácidos nucleicos con una afinidad y especificidad relativamente superior para la unión a la transcriptasa inversa, mediante lo cual se pueden identificar los ligandos de ácido nucleico de la transcriptasa inversa.

26. El ligando de ácido nucleico no natural purificado y aislado del párrafo 24, en el que dicha transcriptasa inversa es Tth polimerasa y en el que dicho ligando de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes de secuencias complementarias de las mismas.

27. El ligando de ácido nucleico no natural purificado y aislado del párrafo 24, en el que dicha transcriptasa inversa es Tth polimerasa y en el que dicho ligando de ácido nucleico es sustancialmente homólogo a la Tth polimerasa y tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse a la misma que un ligando seleccionado del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes de secuencias complementarias de las mismas.

28. El ligando de ácido nucleico no natural purificado y aislado del párrafo 24, en el que dicha transcriptasa inversa es Tth polimerasa y en el que dicho ligando de ácido nucleico tiene sustancialmente la misma estructura y sustancialmente la misma capacidad de unirse a Tth polimerasa que un ligando seleccionado del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes de secuencias complementarias de las mismas.

29. Un método para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que comprende:

a) mezclar una muestra que contiene una secuencia de ácido nucleico que va a amplificarse con cebadores que son complementarios a las secuencias que flanquean la secuencia a amplificar, una polimerasa termoestable, y un ligando de ácido nucleico que es capaz de inhibir la polimerasa a temperaturas ambientes, aunque permite que la polimerasa se active a temperaturas elevadas; y

b) realizar las etapas de PCR estándar de fusión del ácido nucleico diana, hibridar los cebadores al ácido nucleico diana y sintetizar el ácido nucleico diana, mediante ciclado térmico de la mezcla.

30. El método del párrafo 29, en el que dicha polimerasa termoestable es Taq polimerasa y en el que dicho ligando de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes de secuencias complementarias de las mismas.

31. El método del párrafo 29, en el que dicha polimerasa termoestable es Taq polimerasa y en el que dicho ligando de ácido nucleico es sustancialmente homólogo a la Taq polimerasa y tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse a la misma que un ligando seleccionado del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes de secuencias complementarias de las mismas.

32. El método del párrafo 29, en el que dicha polimerasa termoestable es Taq polimerasa y en el que dicho ligando de ácido nucleico tiene sustancialmente la misma estructura que la Taq polimerasa y tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse a la misma que un ligando seleccionado del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes de secuencias complementarias de las mismas.

33. El método del párrafo 29, en el que dicha polimerasa termoestable es Tth polimerasa y en el que dicho ligando de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes de secuencias complementarias de las mismas.

34. El método del párrafo 29, en el que dicha polimerasa termoestable es Tth polimerasa y en el que dicho ligando de ácido nucleico es sustancialmente homólogo a la Tth polimerasa y tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse a la misma que un ligando seleccionado del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes de secuencias complementarias de las mismas.

35. El método del párrafo 29, en el que dicha polimerasa termoestable es Tth polimerasa y en el que dicho ligando de ácido nucleico tiene sustancialmente la misma estructura que las Tth polimerasas y tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse a las mismas que un ligando seleccionado del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes de secuencias complementarias de las mismas.

36. Un kit de PCR que comprende una ADN polimerasa termoestable y un ligando de ácido nucleico que inhibe dicha polimerasa a temperaturas ambientes, aunque permite que la polimerasa se active a temperaturas elevadas.

37. El kit de PCR del párrafo 36, en el que dicha ADN polimerasa termoestable es Taq polimerasa y en el que dicho ligando de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes de secuencias complementarias de las mismas.

38. El kit de PCR del párrafo 36, en el que dicha ADN polimerasa termoestable es Tth polimerasa y en el que dicho ligando de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes de secuencias complementarias de las mismas.

39. Un método mejorado para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en el que dicha mejora comprende la etapa de añadir a la polimerasa termoestable un ligando de ácido nucleico que inhibe dicha polimerasa a temperaturas ambientes, aunque permite que la polimerasa se active a ciclos de temperaturas elevada del proceso de PCR.

40. Un método de identificación de un interruptor de ácido nucleico, que comprende:

a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos;

b) poner en contacto la mezcla candidata de ácidos nucleicos con un compuesto diana, donde los ácidos nucleicos que tienen una mayor afinidad por la diana en relación con la mezcla candidata se pueden separar del resto de la mezcla candidata;

c) separar los ácidos nucleicos de mayor afinidad de las condiciones del resto de la mezcla candidata, mediante lo cual los ácidos nucleicos de mayor afinidad se separan posteriormente en base a su falta de afinidad con la diana después de la variación en un parámetro del medio; y

d) amplificar los ácidos nucleicos de mayor afinidad para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácidos nucleicos con una afinidad y especificidad relativamente superior para la unión a la polimerasa, mediante lo cual se pueden identificar los ligandos de ácido nucleico de la polimerasa.

TABLA 1

Grupo de Partida de ADNss de Secuencia Aleatoria:
5'-TTCTCGGTTGGTCTCTGGCGGAGC-[N] ₃₀ -TCTTGTGTATGATTGCTTTTCCC-3' (SEC. Nº ID.: 1)
Conjunto I de CEBADOR de PCR para SELEX:
5'-TTCTCGGTTGGTCTCTGGCGGAGC-3' (SEC. Nº ID.: 2) (SEQ ID NO: 2)
5'-BBBTAGGGAAAAGCGAATCATACACAAGA-3' (SEC. Nº ID.: 3) (SEQ ID NO:3)
(B representa Biotina)
Conjunto II de CEBADOR de PCR para SELEX:
5'-GGC <u>GAATTC</u> TTCTCGGTTGGTCTCTGGCGGAGC-3' EcoRI (SEC. Nº ID.: 4)
5'-CGC <u>GGATCC</u> TAATACGACTCACTATAGGGAAAAGCGAATCATACACAAGA-3' BamHI (SEC. Nº ID.: 5)

TABLA 2

SEC. Nº ID.:	Nº de CLON	SECUENCIA (5'-3')
CLASE I		
7	2:	TATCGTTTACTCATT GTTTTG TGTGT
8	34:	ACATTACCCGAGACATTCCCTGAC GTTTTG
9	21:	TGCTGCTCCTTGTTT GTTTTG TCT
10	18:	AGCTTTTGGGGACATTCTAAC GTTTTG TCA
11	19:	AGATGCTTCA GTTTTTCTCTCCGTG
12	16:	T CTTTTG GACTGAAGGTTTGTTGGT
13	12:	ATGGTC TTTTTG TTGTTTGTTT
14	9:	GTGA CTTTTT ACTTGTCTAGGCTG
15	15:	CATCTAT GTCTTC TTTATATTTGG
16	14:	ACTACCTGG TTGTGTG CTTTCCAT
17	25:	ATCCATGAGACTAG GTTGGT TAGGGTGGTG
18	1:	CCCTCATA GTTTAA CTTTACCTGGCTTATC
19	10:	AGTGAACACCTTCT GTTTCG TGAGTC
20	23:	CGTGT GTCTTA GTTAGCTCGTGG
21	24:	TAACGTTGTGT GTTCTG TGCTA
22	26:	AACAGATTTGGTCATAT TCCTTG G
23	27:	TGTGTTAT GCTCCG GTAACAATGCCCTT
24	30:	AATTGTA ATTTTCG GTATCTCTG
25	33:	GCA ATTTCC TGTCCAATCATTGTAG
26	36:	GCTTGAA GCTTTC ACCCATCCTA/GA
27	41:	CTTCTCCTTTATAT GTCTTA CCA
28	42:	TATCGAGTAGACCCTGTT GTTCGT G
29	44:	CGC GTCTAG CTAAGATTTCTACTGATGCAT
30	46:	ATG ATTTTA TGTTTATCCTGTTT
SEC. Nº ID.:	Nº de CLON	SECUENCIA (5'-3')
CLASE II		
31	45:	CAGTCGCTGTACGTGCTCTCCCTATGTAAC
32	6:	CAATCGGTGTACAATATCTTCC
33	28:	CGTTAGCTGGTTAGTTAGTACTAG
34	35:	AGGTAAGCGATTATGGGGTTATCG
35	40:	TAGTTACATGAACATAATCGTGGAG

Tabla 3

SEC.
ID. CLON
Nº Nº

SECUENCIA (5'-3')

Familia I

36	12:	(4)	ggcggagc	GATGTACAGTATC	GCTATCGAAAGAGGCTG
37	15:		ggcggagc	AGTGTGCAGTAGT	GTGATGTCAGAGTATCC
38	18:		ggcggagc	AGTGTGCGGTAGT	GTGATCTGAGAGTATCC
39	26:		ggcggagc	AGTGTGTAGTAGT	GTTACGATGGGGACGG
40	40:		ggcggagc	AGTGTACAGTAGT	GTTCCCGGTAGAGCTAT
41	27:		ggcggagc	AATGTGCAGTATT	GATATCGCTGGTGGTCA
42	10:	(2)	ggcggagcA	AGTGTACAGTAGT	TGCCTACGCTAGTG
43	6:		ggcggagcA	AGTGTGCAGTAGT	TACTCATAAGAGACCA
44	34:		ggcggagcA	AGTGTACAGTAGT	TGCCTACGCTAGTG
45	28:		ggcggagcAC	AATGTGAAGTATT	GGGGTACGTCAGTAG
46	5:		CAAGCGGAAAC	AATGTACAGTATT	GGGATC
47	33:		AAGGCCATT	GATGTACAGTATC	AATGCTGC
48	29:		AATTGGGAAAC	AATGTGCAGTATG	TGAAGG
49	44:		AAATGGGAAAC	AATGTGCAGTATT	GGAAGG
50	30:	(3)	AAGACCAGAC	AATGTACAGTATT	GGCCTGA
76	3:		TCAATACACAAATT	GATGTACAGTGTC	GAT

Familia II

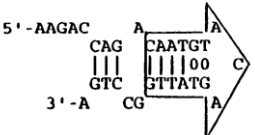
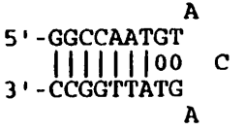
51	42:		TACGCTGACAGGCC	ACGTTTTG	TCATGAT
52	22:		GAGAACTCCGTTCTTA	GCGTATTG	GAGTCC
53	2:		AGGTGGGACATTCTTT	GCGTTATG	TCTCTGA
54	49:		GGGCTCGGAACATTCTTA	GCGTTTTG	TTCC
55	50:		ATAGGCAGGGGACATTGCA	ACCTTTTG	TCA
56	7:		AATTGAAGTGACTTTCTCT	GCGTTTAG	TCG
57	39:		AGGAATCTGGGGCATTCTTT	GCGTTTTG	CG
58	41:		CTCAGGATAAGGTCATTCTA	ACGTTATG	A
59	21:		GATCATCTCAGAGCATTCTTA	GCGTTTTG	T
60	31:		GATCATCTAAGAGCATTCTTA	GCGTTTTG	G
61	43:		CAAAACGAGAGAGCTTTCTGT	GCGTTTAG	C
62	23:		GACCAAGCGTCAAGATATTCAA	ACGTTTTA	
63	25:		AGAAGCATACGAAGACATTCCA	ACGTTTGG	
64	9:	(2)	AATCGATTGTTGAACATTCTG	ACGTTTTG	T
65	17:	(2)	AGAAGCATACGAAGACATTCCA	ACGTTTTG	
66	36:		AGAAGCATACGAAGACATTCCA	ACGTTTTG	

Familia III

77	4:	(2)	CATTGGGCCAGAGGAACACAACCTCAACAG		
----	----	-----	--------------------------------	--	--

TABLA 4		
SEC. Nº ID.:	CLON	SECUENCIA
50	TQ30	5'-ttctcgggttggtctctggcggagca AAGACCAGACAATGTACAGTATTGGCCTGA tcttggtatgattcgctttccc-3'
59	TQ21	5'-ttctcgggttggtctctggcggagca GATCATCTCAGAGCATTCTTAGCGTTTTGT tcttggtatgattcgctttccc-3'
67	Trnc.1-30	5'-GGGACCAGACAATGTACAGTATTGTCTGGTCCC-3'
68	Trnc.2-30	5'-GCCGGCCAATGTACAGTATTGGCCGGC-3'
69	Trnc.3-30	5'-GGCCAATGTACAGTATTGGCC-3'
70	Trnc-21	5'-tggcggagc GATCATCTCAGAGCATTCTTAGCGTTTTGT tcttggtatga-3'
71	D.30-D.30	5' - GCCGGCCAATGTACAGTATTGGCCGGC } 5' - GCCGGCCAATGTACAGTATTGGCCGGC } X
72	D.21-D.30	5' - tggcggagcGATCATCTCAGAGCATTCTTAGCGTTTTGTtcttggtatgaT 3' - CGGCCGGTTATGACATGTAACCGCCGT 5' - GCCGGCCAATGTACAGTATTGGCCGGCT T
73	D.30-D.21	3'-agtatgtgttct TGTTTTGCGATTCTTACGAGACTCTACTAG cgaggcggT

TABLA 5

SEC. N° ID.:	N° DE CLON	Estructura secundaria ¹	K _d ² (nM)	T _M ³ (°C)
74	Trnc.A-30 meros)	(30- 	0,6 ± 0,1	51
67	Trnc.1-30 meros)	(33- 	2,0 ± 0,3	77
68	Trnc.2-30 meros)	(27- 	3,1 ± 0,3	81,5
69	Trnc.3-30 meros)	(24- 	2,8 ± 0,4	65,5

¹ La región recuadrada indica el elemento de secuencia conservada con la estructura de tallo-bucle predicha identificada en las secuencias de la Familia I; las líneas verticales significan emparejamientos de bases del tipo Watson-Crick; los círculos muestran un emparejamiento de bases G-T poco habitual.

² Los valores de K_d se midieron mediante la técnica de unión a filtro de nitrocelulosa descrita en el EJEMPLO I.

³ Las transiciones por fusión (T_m) se midieron en un tampón de PCR que contenía Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, pH 8,3, con una rampa de temperatura de 1°C/min.

Listado de secuencias

[0091]

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: LARRY GOLD SUMEDHA JAYASENA

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: LIGANDOS DE ÁCIDO NUCLEICO INHIBIDORES PARA ADN POLIMERASAS

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 77

(iv) DIRECCIÓN POSTAL:

(A) SOLICITANTE: Swanson and Bratschun, L.L.C.

(B) CALLE: 8400 East Prentice Ave., Suite 200

(C) CIUDAD: Denver

(D) ESTADO: Colorado

(E) PAIS: USA

(F) CÓDIGO POSTAL: 80111

(v) FORMATO LEGIBLE POR ORDENADOR:

- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete, 3,5 pulgadas, 1,44 MB de capacidad (B) ORDENADOR: Compatible IBM
(C) SISTEMA OPERATIVO: MS-DOS
(D) PROGRAMA: WordPerfect 6.0
- 5 (vi) FECHA DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US96/_____
(B) FECHA DE REGISTRO:
10 (C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) DATOS DE LA SOLICITUD PREVIA:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/487.426
15 (B) FECHA DE REGISTRO: 7-JUNE-1995
- (vii) DATOS DE LA SOLICITUD PREVIA:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/487,720
20 (B) FECHA DE REGISTRO: 7-JUNE-1995
- (vii) DATOS DE LA SOLICITUD PREVIA:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/484,557
25 (B) FECHA DE REGISTRO: 7-JUNE-1995
- (viii) INFORMACIÓN DEL PROCURADOR/AGENTE:
- (A) NOMBRE: Barry J. Swanson
30 (B) NÚMERO DE REGISTRO: 33,215
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/CERTIFICADO: NEX43C/PCT
- (ix) INFORMACIÓN PARA TELECOMUNICACIONES:
- 35 (A) TELEFONO: (303) 793-3333
(B) TELEFAX: (303) 793-3433
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 1:
- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 78 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
45 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO MOLECULAR: ADN
(ix) CARACTERÍSTICA:
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 1:
50 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCNNNNNNN NNNNNNNNNN 50
NNNNNNNNNN NNNNTCTTGT GTATGATTG CTTTCCCC 78
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 2:
- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
60 (C) TIPO DE HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO MOLECULAR: ADN
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 2:

5 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGC 24

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 3:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 29 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- 15 (ii) TIPO MOLECULAR: ADN
(ix) CARACTERÍSTICA:

- (D) OTRA INFORMACIÓN: N en las posiciones 1, 2, y 3 es biotina

- 20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 3:

NNNTAGGGAA AAGCGAATCA TACACAAGA 29

- 25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 4:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 33 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
30 (C) TIPO DE HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 4:

35 GGCGAATTCT TCTCGGTTGG TCTCTGGCGG AGC 33

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 5:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 50 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- 45 (ii) TIPO MOLECULAR: ADN

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 5:

50 CGCGGATCCT AATACGACTC ACTATAGGGA AAAGCGAATC 40
ATACACAAGA 50

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 6:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 49 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
60 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 6:

ATGCCTAAGT TTCGAACGCG GCTAGCCAGC TTTTGCTGGC 40
5 TAGCCGCGT 49

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

10

- (A) LONGITUD: 74 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 7:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCTATCGT TTA CTCA TTG 40
20 TTTTGTGTGT TCTTGTGTAT GATTCGCTTT TCCC 74

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

25

- (A) LONGITUD: 76 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

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

TCTCGGTTGG TCTCTGGCGG AGCACATTAC CCGAGACATT 40
35 CCTGACGTTT TGTCTTGTGT ATGATTCGCT TTTCCC 76

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

40

- (A) LONGITUD: 72 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

45

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

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

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCTGCTGC TCCTTGTTTCG 40
50 TTTTGTCTTC TTGTGTATGA TTCGCTTTTC CC 72

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

55

- (A) LONGITUD: 78 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

60

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

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

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAGCTTT TGGGGACATT 40
CTAACGTTTT GTCATCTTGT GTATGATTCG CTTTTCCC 78

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 72 pares de bases
- 10 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 11:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAGATGC TTCAGTTTTTC 40
TCTCCGTGTC TTGTGTATGA TTCGCTTTTC CC 72

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 73 pares de bases
- 25 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 12:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCTCTTTT GGAAGTGAAGG 40
TTTGTGTGTT CTTGTGTATG ATTCGCTTTT CCC 73

35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 71 pares de bases
- 40 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 13:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCATGGTC TTTTGTGTTGT 40
TTGTTTGTCT TGTGTATGAT TCGCTTTTCC C 71

50 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 73 pares de bases
- 55 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 14:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCGTGACT TTTTACTTGT 40

CCTAGGCTGT CTTGTGTATG ATTCGCTTTT CCC 73

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 15:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 72 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 15:

15 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCCATCTA TGTCTTCTTT 40
ATATTTGGTC TTGTGTATGA TTCGCTTTTC CC 72

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 16:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 72 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

25 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 16:

30 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCACTACC TGGTTGTGTG 40
CTTCCATTC TTGTGTATGA TTCGCTTTTC CC 72

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 17:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

40 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 17:

45 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCATCCAT GAGACTAGGT 40
TGGTTAGGGT GGTGTCTTGT GTATGATTCG CTTTTC CC 78

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 18:

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

55 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 18:

60 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCCCCTCA TAGTTTAACT 40
TTACCTGGCT TATCTCTTGT GTATGATTCG CTTTTC CC 78

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 74 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 19:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAGTGAA CACCTTCTGT 40
TTCGTGAGTC TCTTGTGTAT GATTCGCTTT TCCC 74

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 71 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 20:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCCGTGTG TCTTAGTTAG 40
CTCGTGGTCT TGTGTATGAT TCGCTTTTCC C 71

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 70 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 21:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCTAACGT TGTGTGTTCT 40
GTGCTATCTT GTGTATGATT CGCTTTTCCC 70

45

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 72 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

55 (ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 22:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAACAGA TTTGGTCATA 40
TTCCTTGATC TTGTGTATGA TTCGCTTTTC CC 72

60

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 76 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 5 (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 23:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCTGTGTT ATGCTCCGGT 40
 AACAAATGCCC TTTCTTGTGT ATGATTGCT TTTCCC 76

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 24:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 70 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 20 (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 24:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAATTGT AATTTCCGTA 40
 TCTCTGTCTT GTGTATGATT CGCTTTTCCC 70

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 25:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 73 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 35 (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 25:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCGCAATT TCCTGTCCAA 40
 TCATTGTAGT CTTGTGTATG ATTCGCTTTT CCC 73

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 26:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 72 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 50 (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 26:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCGCTTGA AGCTTTCACC 40
 CATCCTRATC TTGTGTATGA TTCGCTTTTC CC 72

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 27:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 71 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

- (ii) TIPO MOLECULAR: ADN
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 27:

10 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCCTTCTC CTTTATATGT 40
CTTACCATCT TGTGTATGAT TCGCTTTTCC C 71

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 28:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

15

- (A) LONGITUD: 73 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

20

- (ii) TIPO MOLECULAR: ADN
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 28:

25 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCTATCGA GTAGACCCTG 40
TTGTTCGTGT CTTGTGTATG ATTCGCTTTT CCC 73

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 29:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

30

- (A) LONGITUD: 78 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35

- (ii) TIPO MOLECULAR: ADN
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 29:

40 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCCGCGTC TAGCTAAGAT 40
TTCTACTGAT GCATTCTTGT GTATGATTCG CTTTCCC 78

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 30:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

45

- (A) LONGITUD: 71 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

50

- (ii) TIPO MOLECULAR: ADN
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 30:

55 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCATGATT TTATGTTTAT 40
CCTGTTTTCT TGTGTATGAT TCGCTTTTCC C 71

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 31:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

60

- (A) LONGITUD: 78 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 31:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCCAGTCG CTGTACGTGC 40
TCTCCCTATG TAACTCTTGT GTATGATTCG CTTTCC 78

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 70 pares de bases

15 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 32:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCCAATCG GTGTACAATA 40
TCTTCCTCTT GTGTATGATT CGCTTTTCCC 70

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 33:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 72 pares de bases

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 33:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCCGTTAG CTGGTTAGTT 40
AGTACTAGTC TTGTGTATGA TTCGCTTTTC CC 72

40 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 72 pares de bases

45 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 34:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAGGTAA GCGATTATGG 40
GGTTATCGTC TTGTGTATGA TTCGCTTTTC CC 72

55 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 72 pares de bases

60 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 35:

5 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCTAGTTA CATGAACTAA 40
TCGTGGAGTC TTGTGTATGA TTCGCTTTTC CC 72

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 36:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 36:

20 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCGATGTA CAGTATCGCT 40
ATCGAAAGAG GCTGTCTTGT GTATGATTCG CTTTTCCT 78

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:37:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 37:

35 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAGTGTG CAGTAGTGTG 40
ATGTCAGAGT ATCCTCTTGT GTATGATTCG CTTTTCCT 78

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 38:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

45 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 38:

50 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAGTGTG CGGTAGTGTG 40
ATCTGAGAGT ATCCTCTTGT GTATGATTCG CTTTTCCT 78

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 39:

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 77 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

60 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 39:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAGTGTG TAGTAGTGTT 40
ACGATGGGGA CGGTCTTG TG TATGATTCGC TTTTCCC 77

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 40:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 78 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 40:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAGTGTA CAGTAGTGTT 40
CCCGGTAGAG CTATTCTTGT GTATGATTCG CTTTCCC 78

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 41:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 78 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 41:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAATGTG CAGTATTGAT 40
ATCGCTGGTG GTCATCTTGT GTATGATTCG CTTTCCC 78

35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 42:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 76 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

45 (ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 42:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAAGTGT ACAGTAGTTG 40
CCTACGCTAG TGTCTTG TGT ATGATTCGCT TTTCCC 76

50

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 43:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 78 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 43:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAAGTGT GCAGTAGTTA 40
CTCATAAGAG ACCATCTTGT GTATGATTCTG CTTTCCCC 78

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 44:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 76 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

10 (C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 44:

15

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAAGTGT ACAGTAGTTG 40
CCTACGCTAG TGTCTTGTGT ATGATTCTGCT TTTCCC 76

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 45:

20

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

25 (C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 45:

30

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCACAATG TGAAGTATTG 40
GGGTACGTCA GTAGTCTTGT GTATGATTCTG CTTTCCCC 78

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 46:

35

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

40 (C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 46:

45

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCCAAGCG GAAACAATGT 40
ACAGTATTGG GATCTCTTGT GTATGATTCTG CTTTCCCC 78

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 47:

50

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

55 (C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 47:

60

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAAGGCC ATTGATGTAC 40
AGTATCAATG CTGCTCTTGT GTATGATTCTG CTTTCCCC 78

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 48:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 78 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 48:

15 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAATTGG GAAACAATGT 40
GCAGTATGTG AAGGTCTTGT GTATGATTCG CTTTCCCC 78

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 49:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

20

- (A) LONGITUD: 78 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 49:

30 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAAATGG GAAACAATGT 40
GCAGTATTGG AAGGTCTTGT GTATGATTCG CTTTCCCC 78

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 50:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

35

- (A) LONGITUD: 78 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

40

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 50:

45 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAAGACC AGACAATGTA 40
CAGTATTGGC CTGATCTTGT GTATGATTCG CTTTCCCC 78

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 51:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

50

- (A) LONGITUD: 77 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

55

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 51:

60 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCACGCTG ACAGGCCACG 40
TTTTGTCATG ATTCTTGTGT ATGATTCGCT TTTCCCT 77

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 52:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 78 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 52:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCGAGAAC TCCGTTCTTA 40
GCGTATTGGA GTCCTCTTGT GTATGATTCG CTTTTCCT 78

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 53:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- 20 (A) LENGTH: 79 base pairs
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 53:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAGGTGG GACATTCTTT 40
GCGTTATGTC TCTGATCTTG TGTATGATTC GCTTTTCCT 79

30 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 54:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 78 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 54:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCGGGCTC GGAACATTCT 40
TAGCGTTTTC TTCCTCTTGT GTATGATTCG CTTTTCCT 78

45 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 55:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 78 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 55:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCATAGGC AGGGGACATT 40
GCAACCTTTT GTCATCTTGT GTATGATTCG CTTTTCCT 78

60 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 56:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 78 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
5 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO MOLECULAR: ADN
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 56:
- 10 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAATTGA AGTGACTTTC 40
TCTGCGTTTA GTCGTCTTGT GTATGATTCG CTTTCCC 78
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 57:
- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 78 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
20 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO MOLECULAR: ADN
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 57:
- 25 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAGGAAT CTGGGGCATT 40
CTTTGCGTTT TCGGTCTTGT GTATGATTCG CTTTCCC 78
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 58:
- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 77 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
35 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO MOLECULAR: ADN
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 58:
- 40 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCCTCAGG ATAAGGTCAT 40
TCTAACGTTA TGATCTTGTG TATGATTCGC TTTTCCC 77
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 59:
- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 78 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
50 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO MOLECULAR: ADN
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 59:
- 55 TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCGATCAT CTCAGAGCAT 40
TCTTAGCGTT TTGTTCTTGT GTATGATTCG CTTTCCC 78
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 60:
- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 78 pares de bases

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 5 (ii) TIPO MOLECULAR: ADN
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 60:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCGATCAT CTAAGAGCAT 40
TCTTAGCGTT TTGGTCTTGT GTATGATTCG CTTTCCC 78

10

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 61:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 78 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- 20 (ii) TIPO MOLECULAR: ADN
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 61:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCCAAAAC GAGAGAGCTT 40
TCTGTGCGTT TAGCTCTTGT GTATGATTCG CTTTCCC 78

25

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 62:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 78 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- 35 (ii) TIPO MOLECULAR: ADN
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 62:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCGACCAA GCGTCAAGAT 40
ATTCAAACGT TTTATCTTGT GTATGATTCG CTTTCCC 78

40

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 63:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 78 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- 50 (ii) TIPO MOLECULAR: ADN
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 63:

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAGAAGC ATACGAAGAC 40
ATCCAACGT TTGGTCTTGT GTATGATTCG CTTTCCC 78

55

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 64:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- 60 (A) LONGITUD: 78 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 64:

5

TTTCTCGGTT GGTCTCTGGC GGAGCAATCG ATTGTTGAAC 40
ATTCTGACGT TTTGTCTTGT GTATGATTCG CTTTCCC 78

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 65:

10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15

(C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 65:

20

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAGAAGC ATACGAAGAC 40
ATTCCAACGT TTTGTCTTGT GTATGATTCG CTTTCCC 78

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 66:

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30

(C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 66:

35

TTCTCGGTTG GTCTCTGGCG GAGCAGAAGC ATACGAAGAC 40
ATTCCAACGT TTTGTCTTGT GTATGATTCG CTTTCCC 78

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 67:

40

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

45

(C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 67:

50

GGGACCAGAC AATGTACAGT ATTGTCTGGT CCC 33

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 68:

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

60

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 68:

GCCGGCCAAT GTACAGTATT GGCCGGC 27

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 69:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- 10 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 69:

GGCCAATGTA CAGTATTGGC C 21

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 70:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 51 pares de bases
- 25 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 70:

TGGCGGAGCG ATCATCTCAG AGCATTCTTA GCGTTTTGTT 40
CTTGTGTATG A 51

35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 71:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 55 pares de bases
- 40 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

45 (ix) CARACTERÍSTICA:

(D) OTRAS INFORMACIÓN: N en la posición 28 es un fosforamidito con orientación invertida (enlace 3'-3')

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 71:

GCCGGCCAAT GTACAGTATT GGCCGGCNCG GCCGGTTATG 40
ACATGTAACC GGCCG 55

55 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 72:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 81 pares de bases
- 60 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 72:

5 TGGCGGAGCG ATCATCTCAG AGCATTCTTA GCGTTTTGTT 40
CTTGTGTATG ATTTGCCGGC CAATGTACAG TATTGGCCGG 80
C 81

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 73:

10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 81 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 73:

20

GCCGGCCAAT GTACAGTATT GGCCGGCTTT TGGCGGAGCG 40
ATCATCTCAG AGCATTCTTA GCGTTTTGTT CTTGTGTATG 80
A 81

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 74:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 74:

AAGACCAGAG GCCAATGTAC AGTATTGGCC GCCTGA 36

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 75:

40

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 97 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

45 (C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 75:

50

TTCGAGCGTG AATCTGAATT CGCGGCTAGC CAGCTTTTGC 40
TGGCTAGCCG CGGTGGGAAA CTGAGGTAGG TGTTTTCACC 80
TACCTCAGTT TCCCACC 97

55 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 76:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

60 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 76:

5 TCAATACACA AATTGATGTA CAGTGTGAT 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.: 77:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.: 77:

20 CATTGGGCCA GAGGAACACA ACCTCAACAG 30

REIVINDICACIONES

- 1.- Ligando de ácido nucleico para una ADN polimerasa termoestable, en el que el ligando de ácido nucleico se une a dicha polimerasa e inhibe a la misma a temperaturas ambientes, aunque permite que la polimerasa se active a temperaturas elevadas.
- 2.- Ligando de ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que la temperatura ambiente es la temperatura de la habitación o inferior a 40°C.
- 3.- Ligando de ácido nucleico según la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, en el que la temperatura elevada es superior a 40°C.
- 4.- Ligando de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ligando de ácido nucleico es ADN.
- 5.- Ligando de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho ligando de ácido nucleico es de cadena sencilla.
- 6.- Ligando de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha polimerasa deriva de la especie *Thermus*.
- 7.- Ligando de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha ADN polimerasa termoestable es polimerasa de *Thermus aquaticus* (*Taq*), polimerasa de *Thermus thermophilus* (*Tth*) o una transcriptasa inversa.
- 8.- Ligando de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ligando de ácido nucleico comprende la secuencia de consenso:
5'-A/GA/GTGTG/ACAGTAT/GC-3'.
- 9.- Ligando de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ligando de ácido nucleico comprende la secuencia de una cualquiera de las SEC ID Nos. 50, 67, 68, 69 ó 74.
- 10.- Ligando de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ligando de ácido nucleico es uno cualquiera de las SEC ID Nos. 50, 67, 68, 69 ó 74 o un ligando de ácido nucleico que tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse e inhibir la actividad de *Taq* o *Tth* polimerasa que una de las SEC ID Nos: 50, 67, 68, 69 ó 74.
- 11.- Ligando de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ligando de ácido nucleico comprende la secuencia consenso:
5'-A/GCGTTTTG-3'.
- 12.- Ligando de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ligando de ácido nucleico comprende la secuencia de cualquiera de las SEC ID Nos. 59 ó 70.
- 13.- Ligando de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ligando de ácido nucleico es la SEC ID Nos. 59 ó 70 o un ligando de ácido nucleico que tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse e inhibir la actividad de *Taq* o *Tth* polimerasa que la SEC ID No: 59 ó 70.
- 14.- Ligando de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho ligando de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes secuencias complementarias de las mismas.
- 15.- Ligando de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho ligando de ácido nucleico tiene un grado de homología de secuencia primaria superior al 70% y tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse a *Taq* o *Tth* polimerasa que un ligando seleccionado del grupo que consiste en las secuencias establecidas en la Tabla 3 (SEC ID Nos: 36-66, 76, 77), Tabla 2 (SEC ID Nos. 7-35), Tabla 4 (SEC ID Nos. 67-73) o la Tabla 5 (SEC ID No: 74), o las correspondientes secuencias complementarias de las mismas.
- 16.- Ligando de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ligando de ácido nucleico tiene una caperuza en 3'.

17.- Reactivo de PCR que comprende un ligando de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

- 5 18.- Método de producción de un ligando de ácido nucleico para un compuesto diana, en el que el ligando de ácido nucleico es un interruptor de ácido nucleico, comprendiendo dicho método la etapa de producir un ligando de ácido nucleico basado en una secuencia de ácido nucleico identificada por un proceso que comprende las etapas de:
- a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos;
 - b) poner en contacto la mezcla candidata de ácidos nucleicos con un compuesto diana,
 - 10 donde los ácidos nucleicos que tienen una mayor afinidad por la diana en relación con la mezcla candidata se pueden separar del resto de la mezcla candidata;
 - c) separar los ácidos nucleicos de mayor afinidad del resto de la mezcla candidata, mediante lo cual los ácidos nucleicos con una mayor afinidad se separan posteriormente en base a su falta de afinidad con la diana después de la variación de un parámetro del medio; y
 - 15 d) amplificar los ácidos nucleicos de mayor afinidad separados posteriormente en la etapa c) para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácidos nucleicos con una afinidad y especificidad relativamente superior para la unión a la diana y la falta de afinidad con la diana después de la variación de un parámetro del medio,
 - 20 mediante lo cual se pueden identificar los ligandos de ácido nucleico de la diana.

19.- Método según la reivindicación 18, en el que el parámetro del medio es la temperatura.

20.- Método según la reivindicación 18 ó 19, en el que la diana es una ADN polimerasa termoestable.

25

5

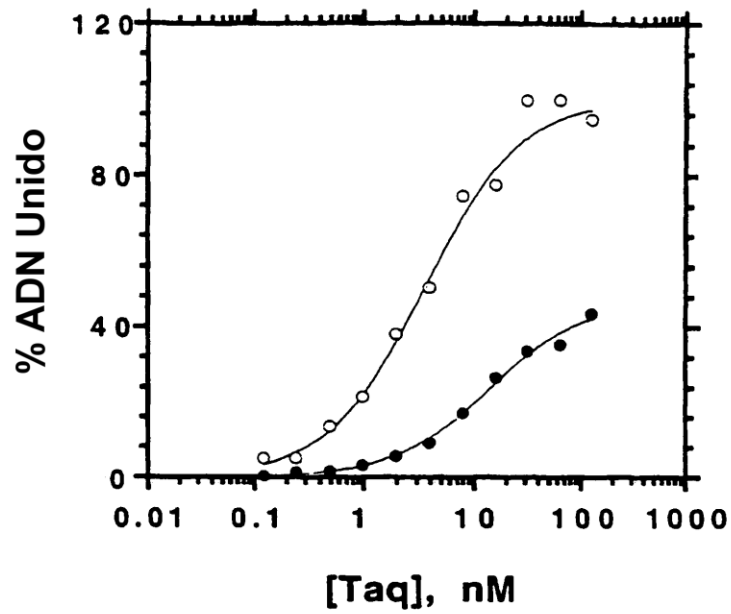


Fig. 1A

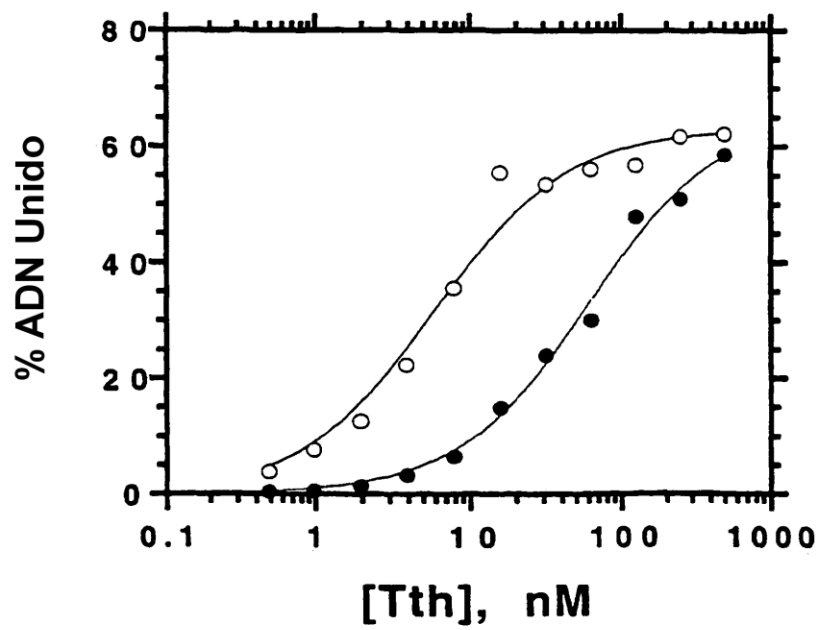


Fig. 1B

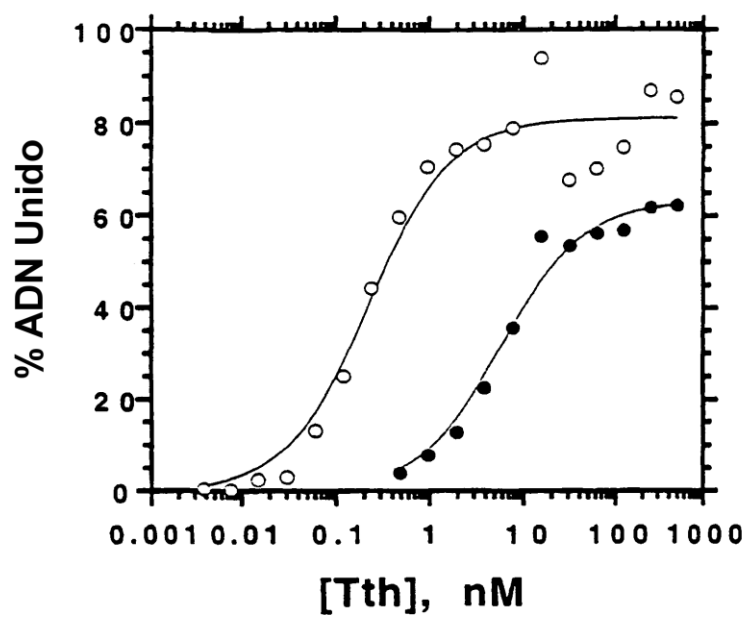


Fig. 2A

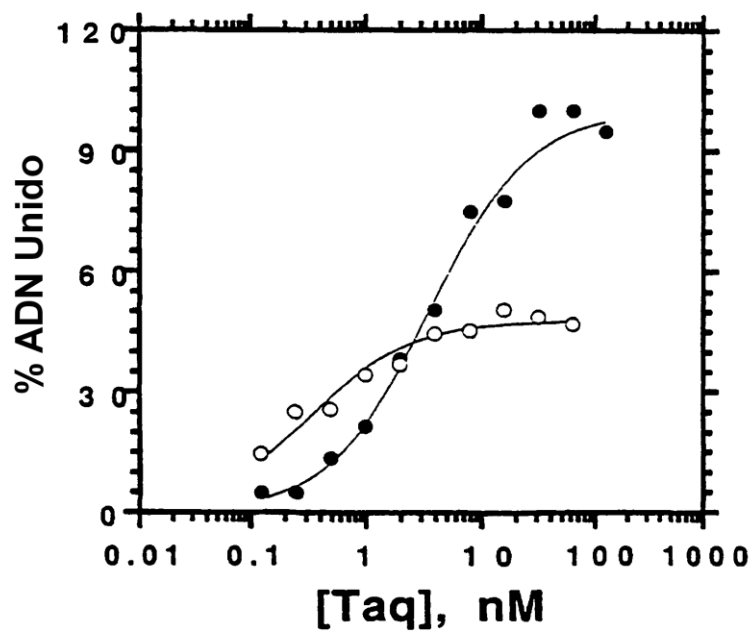


Fig. 2B

5

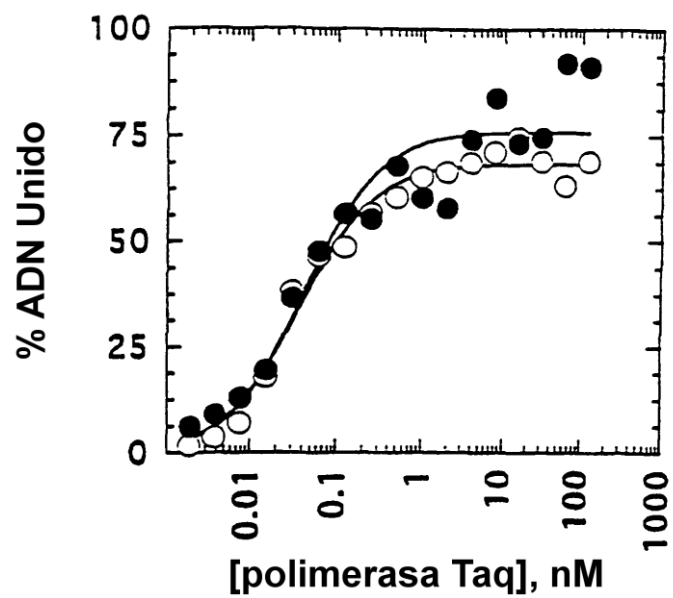


Fig. 3A

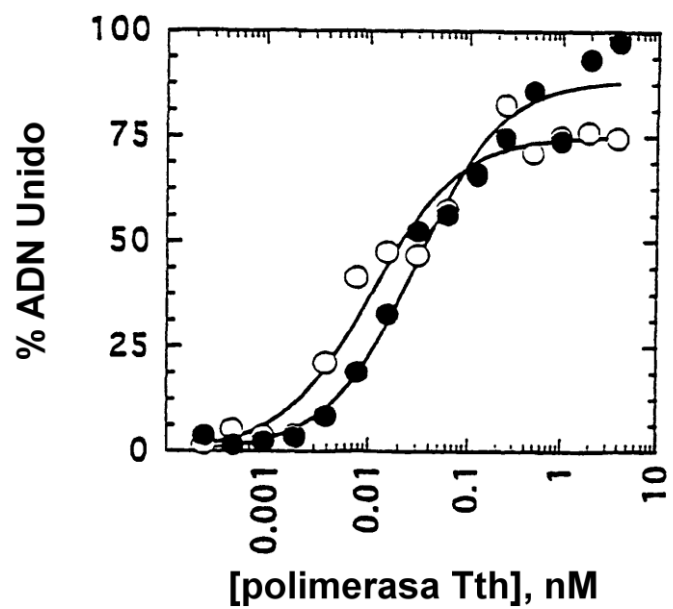


Fig. 3B

1.

Ensayo de actividad de polimerasa

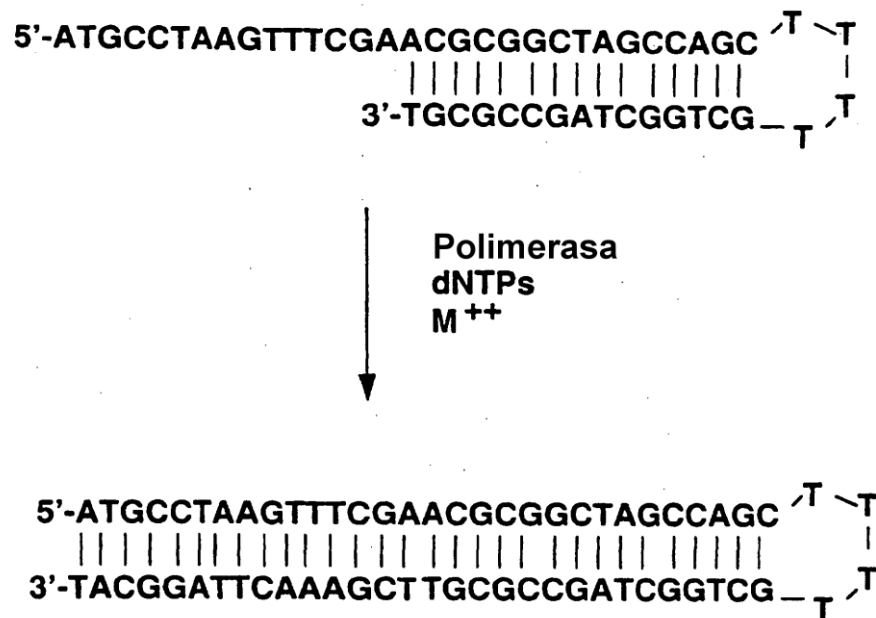


Fig. 4

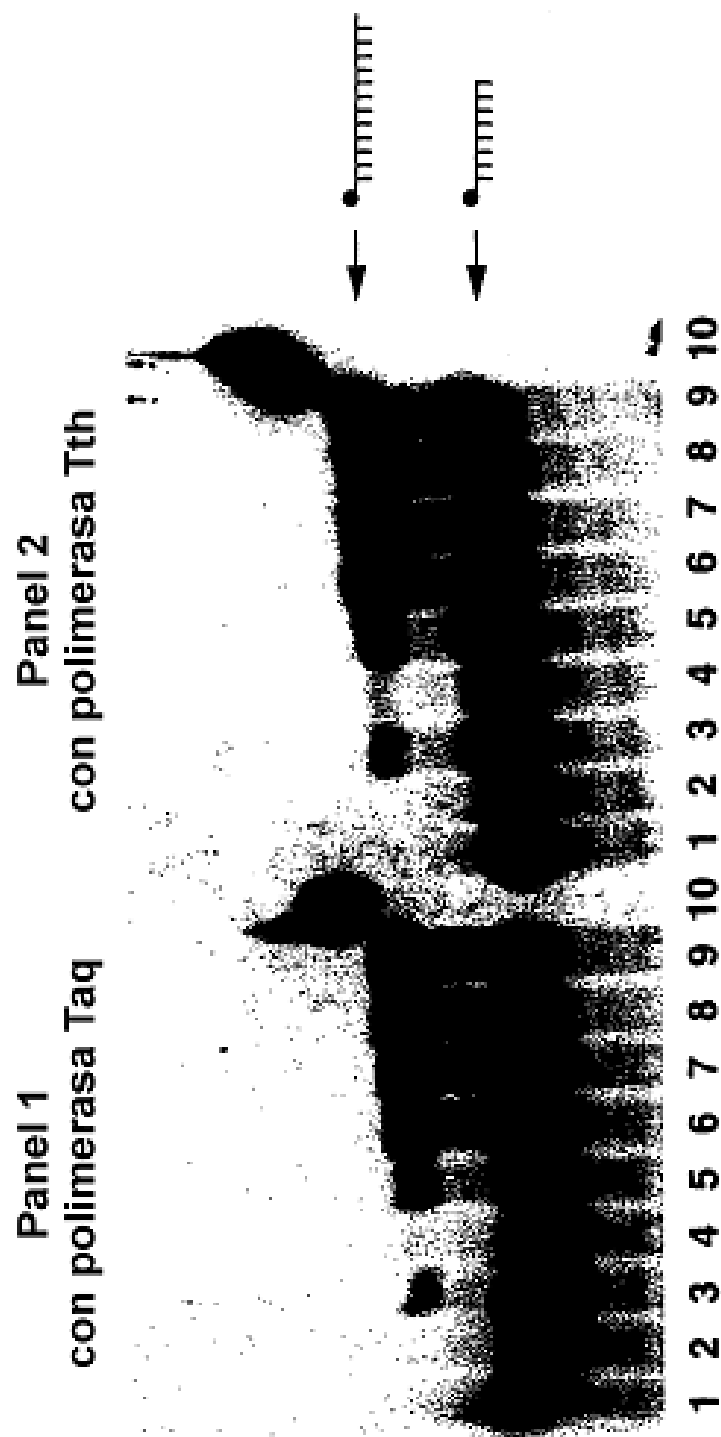


FIGURA 5A

FIGURA 5B

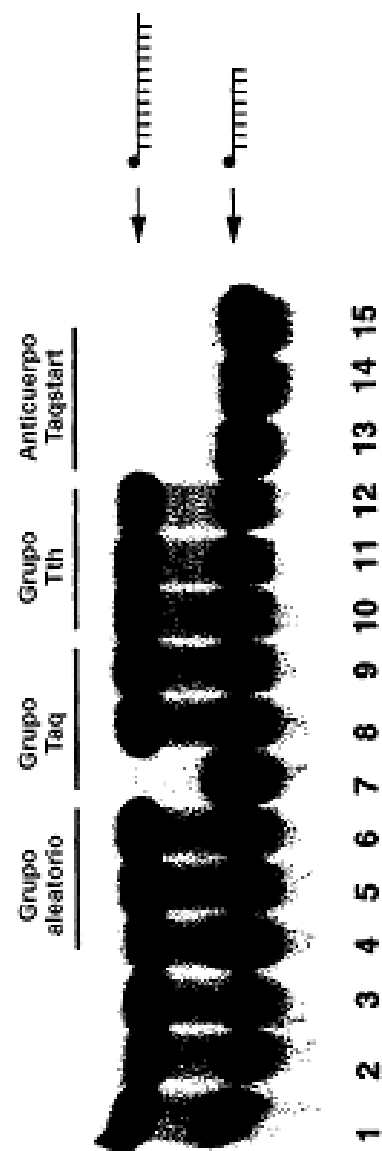
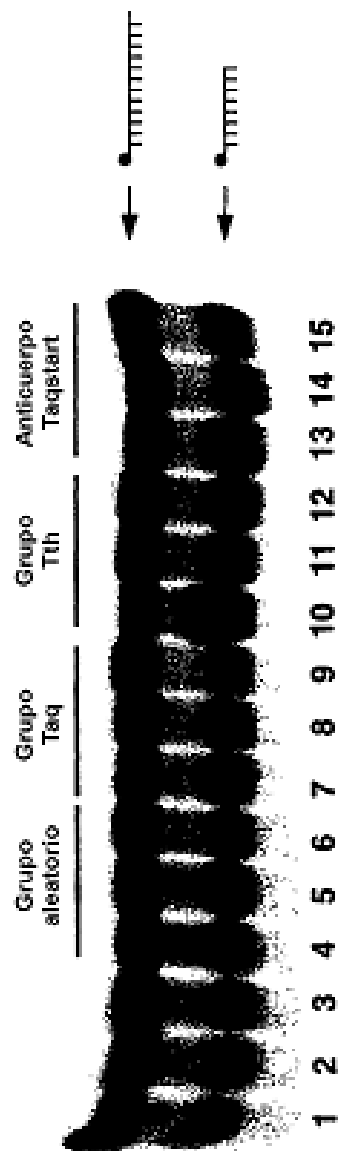


FIGURA 5B



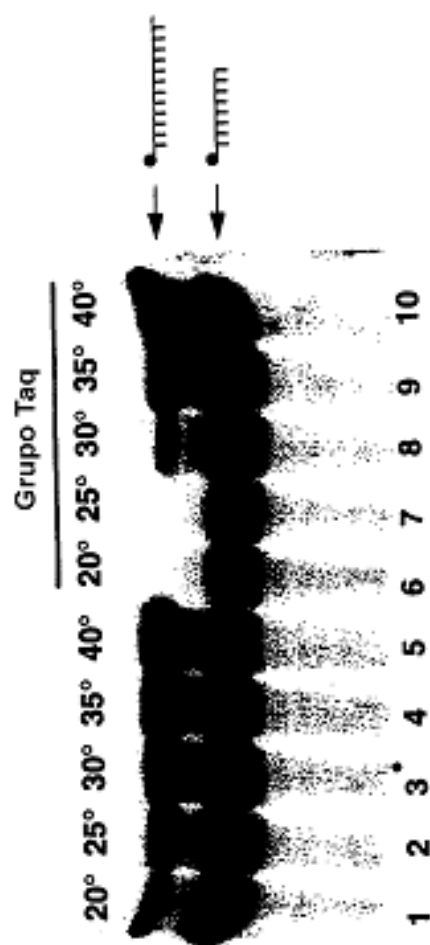


FIGURA 5D

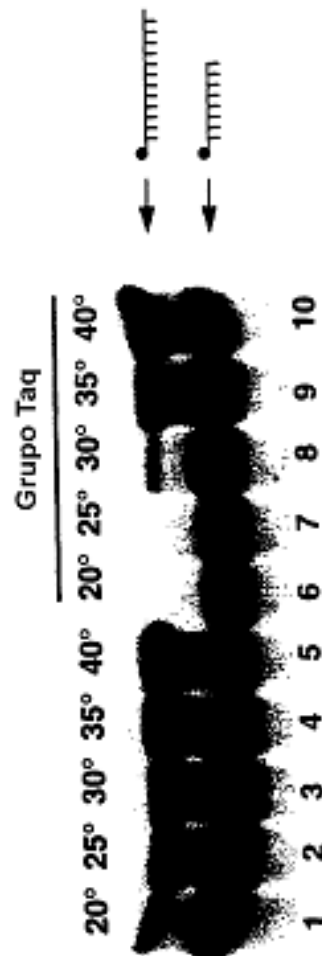


FIGURA 5E

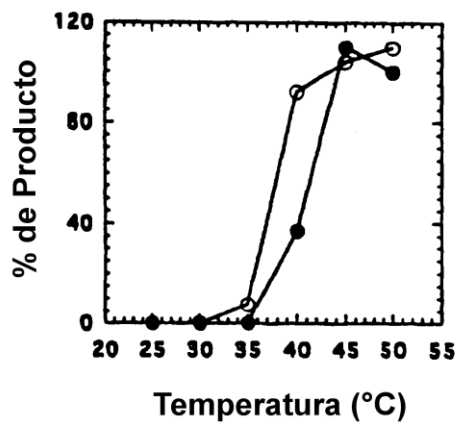
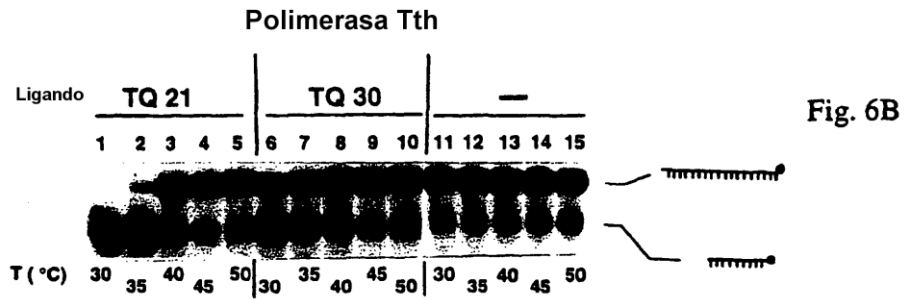
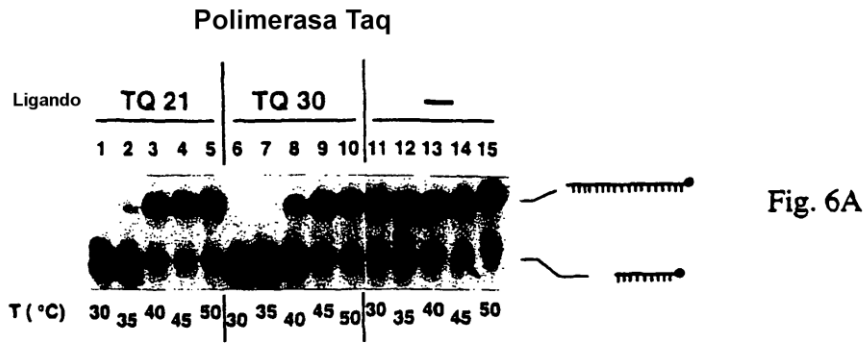


Fig. 6C

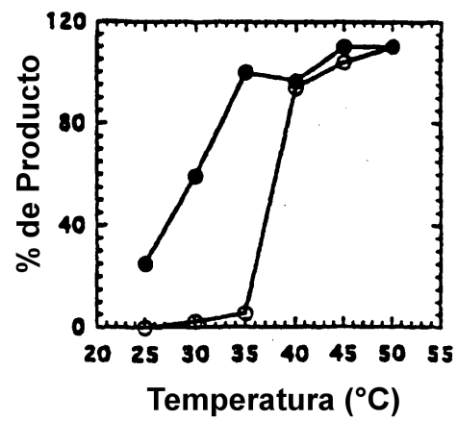


Fig. 6D

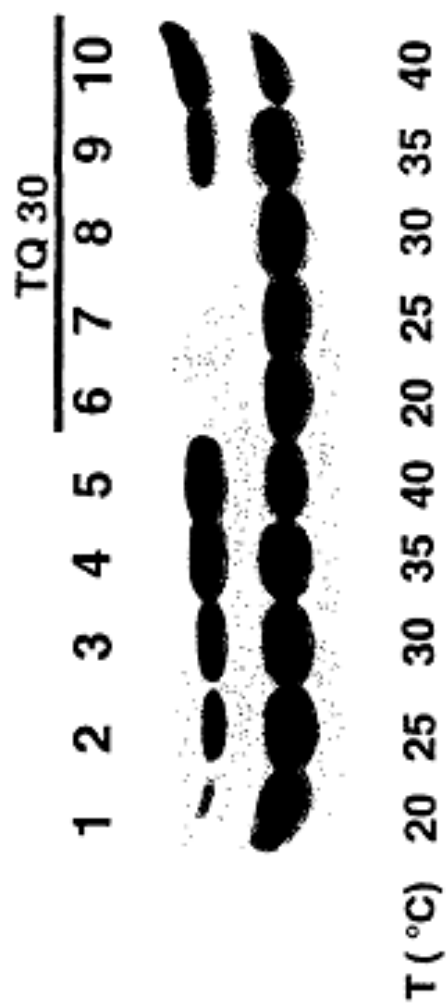


Fig. 7A

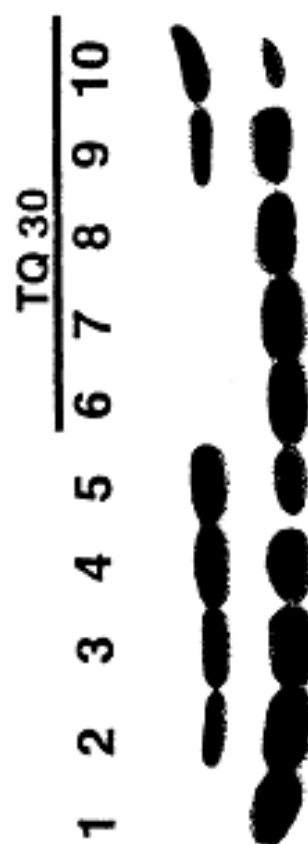


Fig. 7B

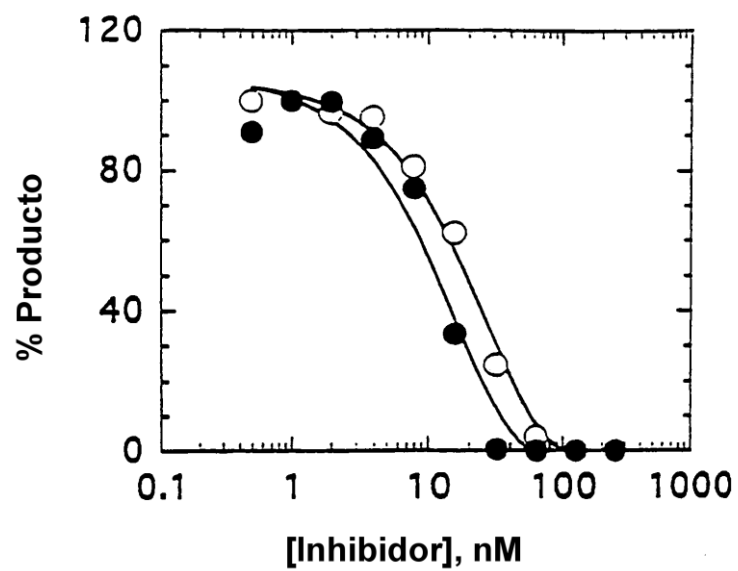


Fig. 8A

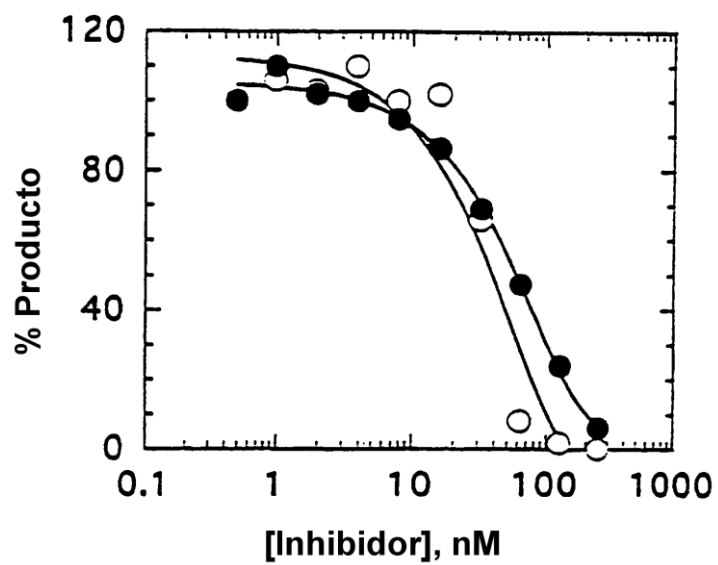


Fig. 8B

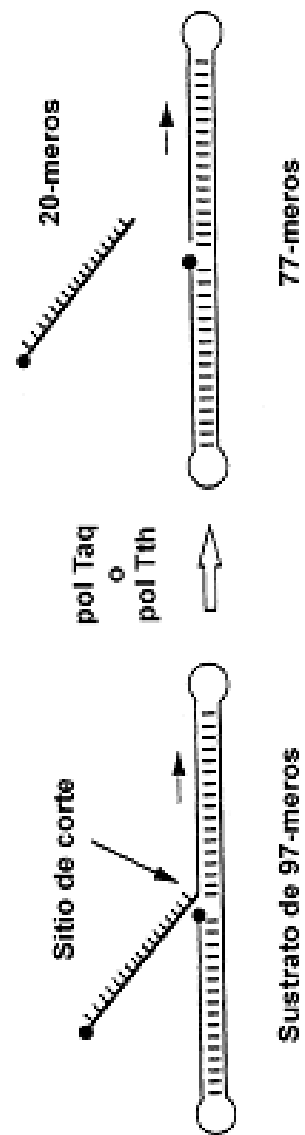


Fig. 9

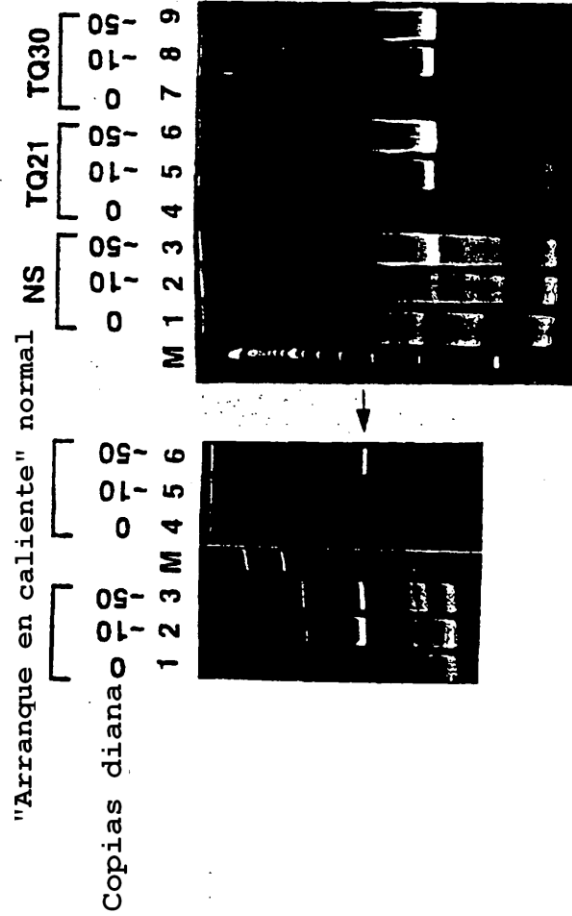


Fig. 10A

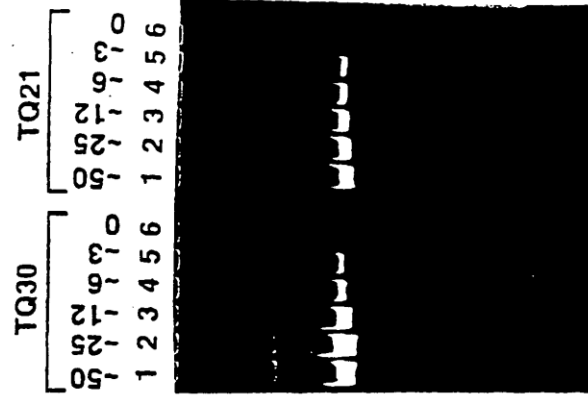


Fig. 10B

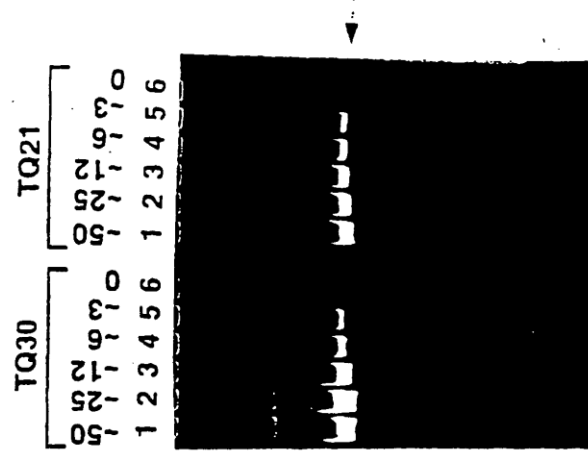


Fig. 10C

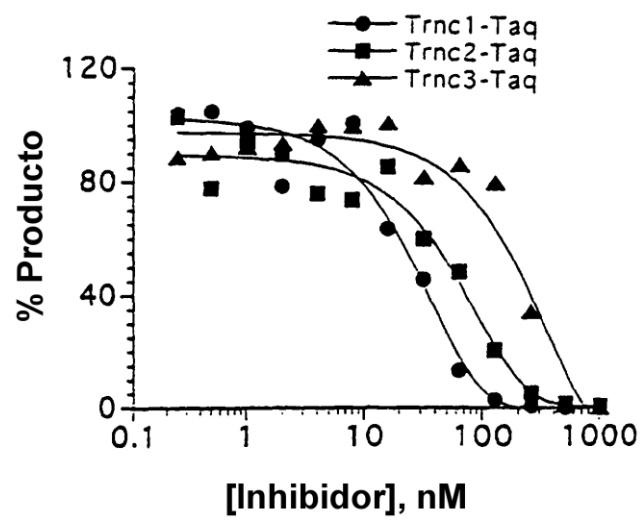


Fig. 11

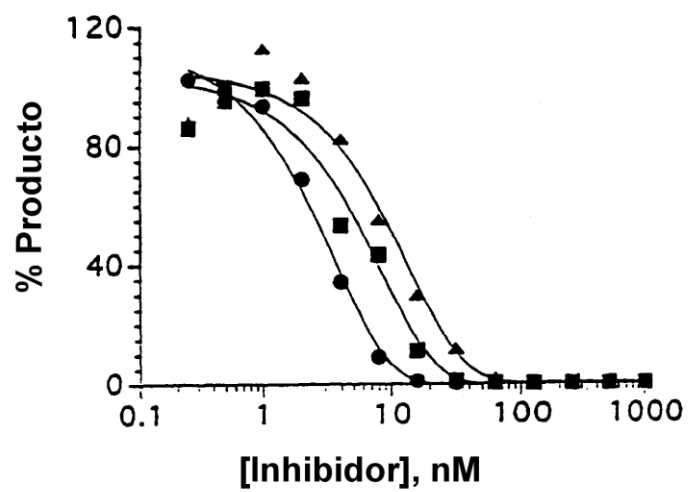


Fig. 12

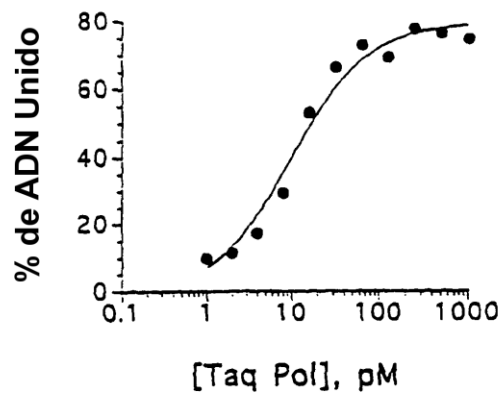


Fig. 13A

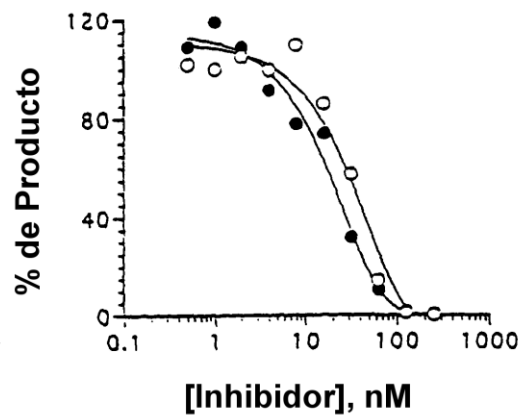


Fig. 13B

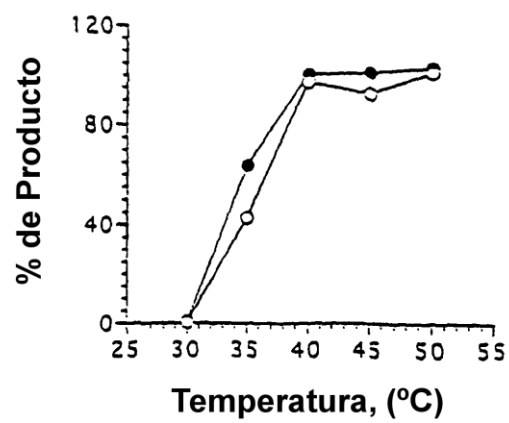


Fig. 13C

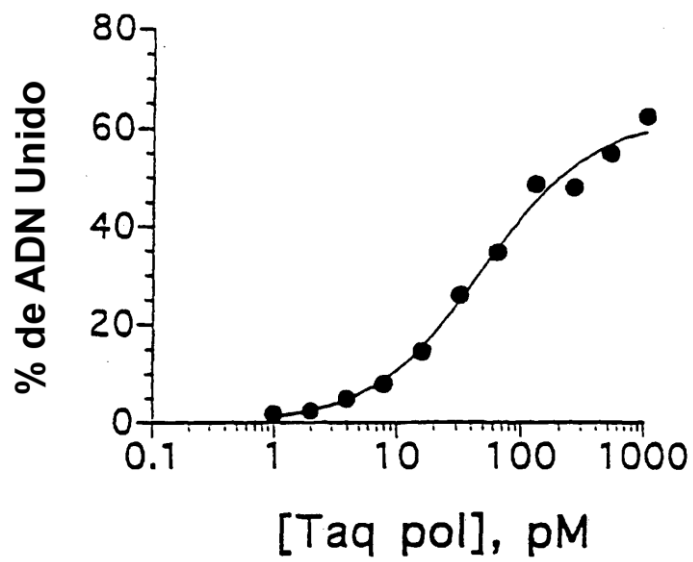


Fig. 14A

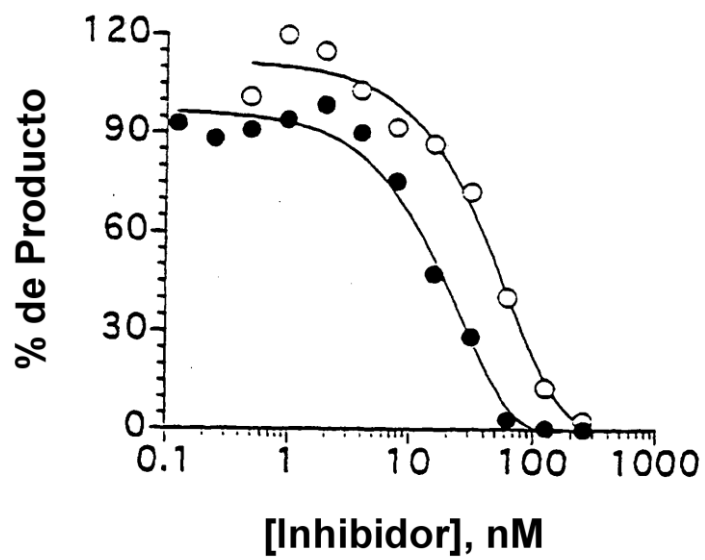


Fig. 14B

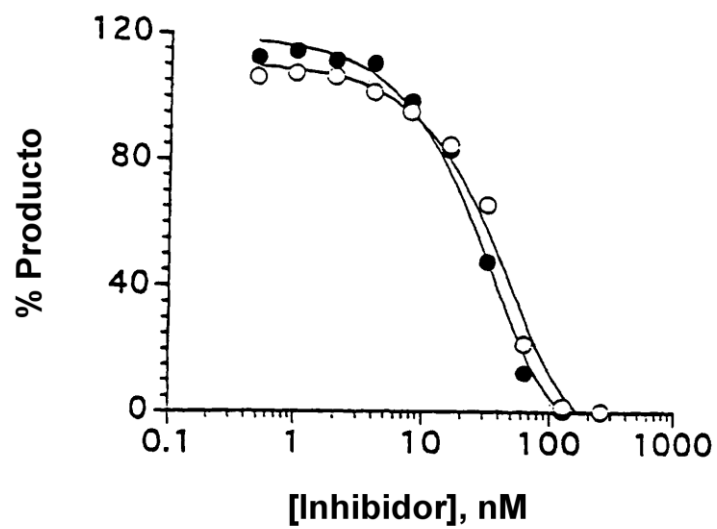


Fig. 15A

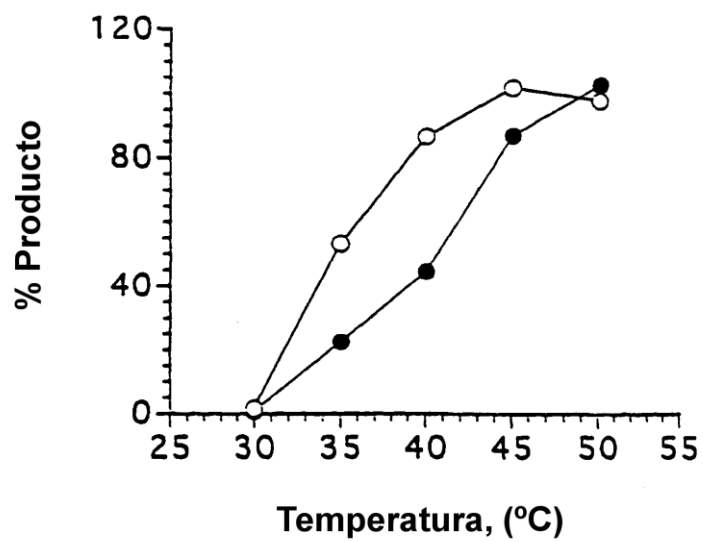


Fig. 15B

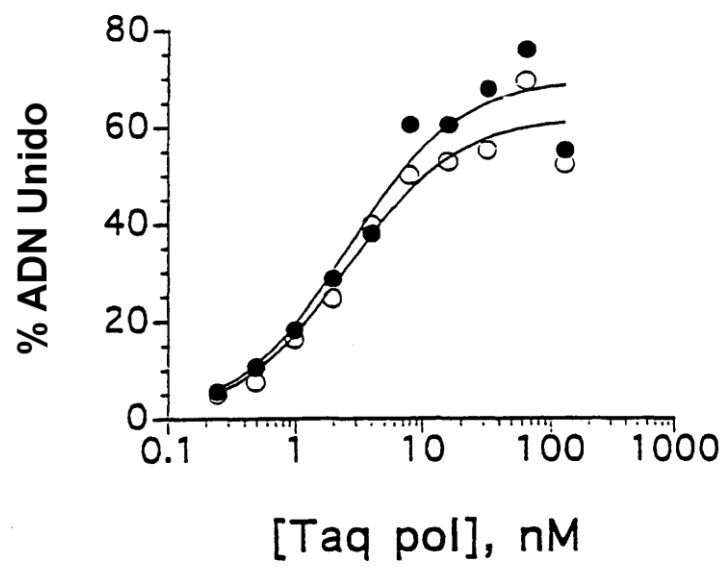


Fig. 16A

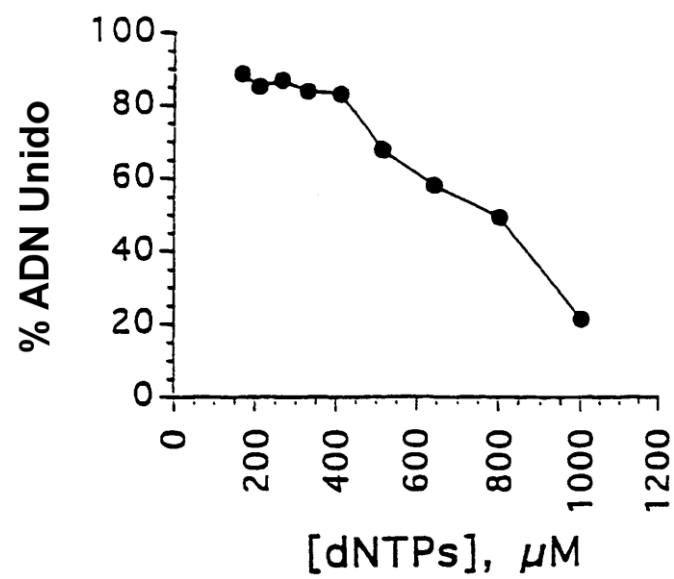


Fig. 16B