(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 373 496**

(51) Int. CI.:
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **08747528 .1**
(96) Fecha de presentación: **02.05.2008**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2152910**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **17.02.2010**

(54) Título: **DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA A TRIAZOL EN ASPERGILLUS.**

(30) Prioridad:
04.05.2007 US 916193 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.02.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.02.2012

(73) Titular/es:
MYCONOSTICA LIMITED
SOUTH COURT SHARSTON ROAD
SHARSTON MANCHESTER M22 4SN, GB

(72) Inventor/es:
ROCHA, Eleusa Maria, F.;
PARK, Steven y
PERLIN, David, S.

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Detección de la resistencia a triazol en Aspergillus

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos Nº 60/916.193, presentada el 4 de mayo de 2007.

Antecedentes

Las infecciones fúngicas son una causa significativa de morbilidad y mortalidad en diversos pacientes gravemente enfermos. Por ejemplo, los hongos pueden causar infecciones superficiales y a menudo diseminadas fatales en pacientes inmunodeficientes. Las infecciones fúngicas sistémicas causan aproximadamente el 25 % de las muertes relacionadas con infección en pacientes leucémicos y el 5-10 % de las muertes en pacientes que se han sometido a transplante de pulmón, páncreas o hígado. También se sabe que se produce septicemia fúngica adquirida en hasta el 13 % de lactantes nacidos con poco peso. Los miembros del género *Aspergillus* son la segunda causa más común de infecciones fúngicas, tras los miembros del género *Candida*.

Las infecciones fúngicas causadas por miembros del género *Aspergillus* se tratan habitualmente con triazoles. Los triazoles actúan bloqueando la ruta biosintética de ergosterol en la fase de desmetilación del C14. Chamilos et al. Drug Resistance Updates (2005) 8: 344- 358. Los triazoles incluyen, por ejemplo, voriconazol, isavuconazol, ravuconazol, itraconazol y posaconazol. Aunque los triazoles han sido eficaces en el tratamiento de infecciones fúngicas por *Aspergillus*, ha habido un aumento de la resistencia de *Aspergillus* al tratamiento con triazol. Chamilose et al., *supra*. Dicha resistencia puede hacer ineficaz al tratamiento con triazol.

Reconocer si una infección fúngica particular comprende *Aspergillus* resistente a triazol es importante para proporcionar la atención adecuada a los pacientes. Por lo tanto, se necesitan procedimientos para determinar si un hongo *Aspergillus* particular es susceptible al tratamiento con triazol.

Resumen

En un aspecto, se proporcionan procedimientos para detectar hongos resistentes a triazol en una muestra que comprende evaluar la muestra en busca de la presencia de un gen que codifica un factor de transcripción AzRF1 mutante, en el que el AzRF1 mutante contiene una deleción de los restos QSQS en la posición 559-562 de dicho gen y correlacionar la presencia del gen mutante con la presencia del hongo resistente a triazol. En algunos aspectos, la evaluación implica medir el nivel de expresión de dicho gen. En algunas realizaciones, la evaluación comprende poner en contacto a dicha muestra con un oligonucleótido capaz de hibridar con dicho gen mutante. El oligonucleótido puede comprender un marcador detectable. En un ejemplo, el oligonucleótido comprende un fluoróforo y un cromóforo, mientras que en otro, el oligonucleótido comprende un fluoróforo y un desactivador de fluorescencia no fluorescente.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID Nº 5 o la SEC ID Nº 6. En una realización, el oligonucleótido puede comprender más del 90 % de homología con la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID Nº 5 o la SEC ID Nº 6. En otra, el oligonucleótido puede comprender la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID Nº 7, la SEC ID Nº 8 o la SEC ID Nº 9.

En algunos aspectos, el gen mutante se amplifica antes de dicha hibridación. La amplificación puede comprender PCR. La amplificación también puede comprender poner en contacto a la muestra con cebadores que tienen la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID Nº 3 y la SEC ID Nº 4.

En otras realizaciones, el hongo resistente a triazol pertenece al género *Aspergillus*. El hongo resistente a triazol puede ser *Aspergillus fumigatus*.

En algunos casos, el hongo resistente a triazol es resistente a itraconazol, posaconazol, voriconazol, isavuconazol o ravuconazol.

En otra realización, un procedimiento de detección de hongos resistentes a triazol en una muestra comprende (A) evaluar la muestra en busca de la presencia de un gen que codifica un factor de transcripción AzRF1 y (B) correlacionar la presencia del gen con la presencia del hongo resistente a triazol. En algunos aspectos, la evaluación implica medir el nivel de expresión del gen.

En otro aspecto, se proporciona un kit para detectar hongos resistentes a triazol en una muestra que comprende un oligonucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID Nº 5 o la SEC ID Nº 6 o una secuencia con más del 90 % de homología con la SEC ID Nº 5 o la SEC ID Nº 6. En algunas realizaciones, el oligonucleótido comprende un marcador y el kit comprende además uno o más cebadores de amplificación.

Otros objetos, características y ventajas se volverán evidentes a partir de la siguiente descripción. La descripción detallada y los ejemplos específicos se proporcionan solamente como ilustración. Además, los ejemplos demuestran

el principio de la invención y no puede esperarse ilustrar específicamente la aplicación de esta invención para todos los ejemplos donde será obviamente útil para los especialistas en la técnica anterior.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un alineamiento de secuencia de la región del dominio de unión a ADN del agrupamiento binuclear Zn2Cys6 similar GAL4 de los 8 supuestos factores de transcripción en *A. fumigatus*.

La figura 2 muestra un alineamiento de secuencia de aminoácidos de factores de transcripción AzRF1 de tipo silvestre y mutante.

La figura 3 proporciona una secuencia de ARNm parcial (SEC ID Nº 1) del factor de transcripción C6 (AzRF1) de *Aspergillus fumigatus* Af293 (AFUA_5G06800) como se indica en el GeneBank en gi|70998461|ref|XM_748860.1.

La figura 4 proporciona la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 2) del factor de transcripción C6 (AzRF1) de *Aspergillus fumigatus* Af293, como se indica en el GeneBank en gi|70998462|ref|XP_753953.1.

Descripción de las secuencias

La SEC ID Nº 3, 5'-CGGTTAGCGTCGATGCTGC-3', es un cebador directo ejemplar para reacciones de amplificación.

La SEC ID Nº 4, 5'-AGGACATCTCCGAGCGGTC-3', es un cebador inverso ejemplar para reacciones de amplificación.

La SEC ID Nº 5, 5'-CCGCAGTCTCAGTCTCAGTCTCAGTCTCAT-3', es una sonda de detección ejemplar.

La SEC ID Nº 6, 5'-ACCGCAGTCTCAGTCTCAGTCTCAGTCTCATT-3', es otra sonda de detección ejemplar.

La SEC ID Nº 7, 5'-CGGCAGCCCGCAGTCTCAGTCTCAGTCTCAGTCTCATGCTGCCG-3', es una sonda de detección ejemplar.

La SEC ID Nº 8, 5'-CGGCGGCACCGCAGTCTCAGTCTCAGTCTCAGTCTCATTGCCGCCG-3', es otra sonda de detección ejemplar.

La SEC ID Nº 9, 5'-CGGCGGCCCGCAGTCTCAGTCTCAGTCTCAGTCTCATGCCGCCG-3', es otra sonda de detección ejemplar.

Descripción detallada

Los inventores han descubierto regiones de ADN específicas de hongos mutantes que son resistentes a fármacos con triazol. Por consiguiente, estas regiones de ADN pueden usarse para determinar si una muestra contiene hongos resistentes a triazol. Por lo tanto, se proporcionan procedimientos de detección de hongos resistentes a triazol, como son nuevas sondas y cebadores que pueden usarse para detectar estas regiones.

Detección de resistencia a triazol

En un aspecto, se proporcionan procedimientos para detectar hongos resistentes a triazol en una muestra, que comprenden evaluar la muestra en busca de la presencia de un gen que codifica un factor de transcripción AzRF1 mutante. En una realización, los procedimientos comprenden evaluar la muestra en busca de la presencia de un gen que codifica un factor de transcripción AzRF1 mutante, en los que el AzRF1 mutante contiene una deleción de los restos QSQS en la posición 559-562 del gen y correlacionar la presencia del gen mutante con la presencia del hongo resistente a triazol.

En otra realización, la resistencia a triazol puede evaluarse en hongos midiendo la actividad del gen AzRF1 en los hongos. En particular, se ha descubierto que los hongos resistentes a triazol poseen cantidades anormales del factor de transcripción AzRF1. Por lo tanto, la medición del número de copias del gen AzRF1 o sus niveles de expresión puede ser útil para detectar resistencia a triazol. En algunos aspectos, dichos procedimientos de detección implican evaluar si la actividad del gen AzRF1 en las cepas fúngicas de ensayo es 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces o más superior a los niveles típicos.

Pueden obtenerse muestras de fuentes biológicas o no biológicas. Los ejemplos de fuentes biológicas incluyen, aunque no se limitan a, fluido biológico, tejido, o una combinación de los mismos. Los ejemplos de fuentes no biológicas incluyen, aunque no se limitan a, muestras obtenidas del entorno, tales como una muestra de aire, una muestra de agua, una muestra de suelo, o combinaciones de las mismas. Otros ejemplos de fuentes no biológicas son una pieza de un vehículo, vehículo acuático, aeronave, edificio o vivienda.

En una realización, se proporcionan procedimientos para la detección rápida de la presencia o ausencia en una muestra de un hongo resistente a triazol que pertenece al género *Aspergillus*. Los procedimientos implican detectar

en la muestra una región de ADN fúngico que es específica de *Aspergillus* resistente a triazol. La presencia en una muestra de una región de ADN fúngico que es específica para un gen resistente a triazol particular es indicativa de la presencia de un hongo que pertenece a ese tipo de género. La ausencia de la muestra de una región de ADN fúngico que es específico para un gen resistente a triazol particular es indicativa de la ausencia de un hongo que pertenece a ese tipo de género.

Los procedimientos para detectar la presencia de un hongo resistente a triazol que pertenece al género *Aspergillus* pueden realizarse en cualquier muestra. Los tipos específicos de muestra se describen con más detalle a continuación. En una realización, los procedimientos se realizan en una muestra que se sabe que contiene un hongo. Por ejemplo, los procedimientos pueden realizarse en una muestra que ya se ha sometido a un procedimiento de detección panfúngica y se consiguió un resultado positivo. Los procedimientos también pueden realizarse en una muestra para confirmar la identidad de uno o más hongos resistentes a triazol cuya presencia en la muestra se conoce. En otra realización, los procedimientos se realizan en una muestra cuyos estatus de contención de hongo no se conoce.

En algunas realizaciones, los procedimientos de detección pueden usarse para detectar la presencia o ausencia de cualquier especie resistente a triazol de hongos pertenecientes al género *Aspergillus*. Por ejemplo, el hongo puede ser *Aspergillus alliaceus, Aspergillus alutaceus, Aspergillus atroviolaceus, Aspergillus caesiellus, Aspergillus candidus, Aspergillus carneus, Aspergillus chevalieri, Aspergillus clavato-nanicus, Aspergillus clavatus, Aspergillus conicus, Aspergillus deflectus, Aspergillus fischerianus, Aspergillus flavipes, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus glaucus, Aspergillus hollandicus, Aspergillus j anus, Aspergillus japonicus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger, Aspergillus niger var. awamorii, Aspergillus niveus, Aspergillus ochraceus, Aspergillus oryzae, Aspergillus penicilloides, Aspergillus reptans, Aspergillus restrictus, Aspergillus rubrobrunneus, Aspergillus spinosus, Aspergillus sydowii, Aspergillus tamarii, Aspergillus terreus, Aspergillus tetrazonus, Aspergillus unguis, Aspergillus ustus* o *Aspergillus versicolor*.

En una realización, se detecta la propia la región fúngica de ADN que es específica para *Aspergillus* resistente a triazol ("la región fúngica"). En otra realización, se detecta cualquier ARN transcrito a partir de la región de ADN fúngico.

En una realización, solamente se detecta la región fúngica. En otra realización, la región fúngica se detecta como parte de una secuencia más grande. Por ejemplo, la región puede detectarse como parte de una secuencia que tiene secuencias flanqueantes.

La región fúngica puede detectarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. La región fúngica se detecta preferiblemente usando una sonda que hibrida específicamente con la región. En un aspecto, la detección comprende poner en contacto a la sonda con la muestra en condiciones en las que la sonda hibrida específicamente con la región, si está presente, y determinar la presencia o ausencia del producto de hibridación. La presencia del producto de hibridación indica la presencia de la región fúngica. A la inversa, la ausencia del producto de hibridación indica la ausencia de la región fúngica.

La sonda es habitualmente un ácido nucleico, tal como ADN, ARN, APN o un ácido nucleico sintético. Una sonda hibrida específicamente con las regiones fúngicas si ésta hibrida preferente o selectivamente con la región fúngica y no con otras secuencias de ADN o ARN.

En una realización, una sonda hibrida específicamente con la región fúngica en condiciones rigurosas. Las condiciones de hibridación de diversas rigurosidades se conocen bien en la técnica (por ejemplo, Sambrook et al, 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press; y Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2, Ausubel et al, Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York (1995)). La detección puede realizarse en condiciones de baja rigurosidad, por ejemplo en presencia de una solución tamponada de formamida del 30 al 35 %, NaCl 1 M y SDS (dodecil sulfato sódico) al 1 % a 37 ºC seguida de un lavado en de 1x (Na^+ 0,1650 M) a 2x (Na^+ 0,33 M) SSC (citrato sódico convencional) a 50 ºC. La detección puede realizarse en condiciones de rigurosidad moderadas, por ejemplo en presencia de una solución tampón de formamida del 40 al 45 %, NaCl 1 M, y SDS al 1 % a 37 ºC, seguida de un lavado en de 0,5x (Na^+ 0,0825 M) a 1x (Na^+ 0,1650 M) SSC a 55 ºC. La detección puede realizarse en condiciones de alta rigurosidad, por ejemplo en presencia de una solución tamponada de formamida al 50 %, NaCl 1 M, SDS al 1 % a 37 ºC, seguida de un lavado en 0,1x (Na^+ 0,0165 M) SSC a 60 ºC.

La sonda puede ser de la misma longitud que, más corta que o más larga que la región fúngica. La sonda tiene normalmente al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 45, al menos 50, al menos 75 o al menos 100 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la sonda puede tener de 5 a 200, de 7 a 100, de 10 a 50 nucleótidos de longitud. La sonda tiene preferiblemente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ó 40 nucleótidos de longitud. La sonda incluye preferiblemente una secuencia que comparte al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % de homología en base a la identidad de secuencia con la región fúngica. La homología puede determinarse como se ha descrito anteriormente.

En una realización, la sonda está marcada de forma detectable. Puede usarse cualquier marcador detectable. Las marcas detectables incluyen, aunque no se limitan a, moléculas fluorescentes, radioisótopos, por ejemplo ^{125}I, ^{35}S, enzimas, anticuerpos y enlazadores, tales como biotina.

La sonda puede ser una sonda de baliza molecular. Véase, por ejemplo la Patente de Estados Unidos Nº 6.150.097. Las sondas de baliza molecular comprenden un marcador fluorescente en un extremo y una molécula desactivadora de fluorescencia en el otro. En ausencia de la región a detectar, la sonda forma un bucle de horquilla y la molécula desactivadora de fluorescencia se sitúan muy cerca del marcador fluorescente de modo que no puede detectarse ninguna señal. Durante la hibridación de la sonda con la región a detectar, el bucle se abre y la molécula fluorescente se separa del desactivador de modo que una señal puede detectarse. En la técnica se conocen combinaciones de molécula fluorescente y desactivador adecuadas para su uso en balizas moleculares. Dichas combinaciones incluyen, aunque no se limitan a, carboxifluoresceína (FAM) y dabcilo.

En una realización, la sonda puede inmovilizarse sobre un soporte usando cualquier tecnología que se conoce en la técnica. Los soportes sólidos adecuados se conocen bien e incluyen placas, tales como placas con múltiples pocillos, filtros, membranas, perlas, chips, agujas, tiras reactivas y portadores porosos.

En un aspecto, la detección de la región fúngica comprende amplificar la región fúngica o el ARN transcrito a partir de ella. En una realización, la región se amplifica antes de que se determine su presencia. En otra realización, la región se detecta en tiempo real mientras se determina su presencia. Los procedimientos en tiempo real se describen en los ejemplos y se han descrito en la técnica. Dichos procedimientos se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.487.972 y 6.214.979 y en el documento Afonia et al. (Biotechniques, 2002; 32: 946-9), las cuales se incorporan todas por la presente como referencia.

En una realización, solamente se amplifica la región a detectar. En otras realizaciones, la región a detectar se amplifica como parte de un tramo mucho más grande de ADN o ARN fúngico. Las secuencias de ADN o ARN que tienen al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 150, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 400 o al menos 500 nucleótidos y que comprenden la región a detectar pueden amplificarse. Por ejemplo, secuencias que tienen de 10 a 2000, de 20 a 1500, de 50 a 1000 o de 100 a 500 nucleótidos pueden amplificarse. Dichas secuencias pueden estar situadas cadena arriba del gen diana para fármacos antifúngicos con triazol (14 alfa desmetilasa conocida de otro modo como *Cyp51A* o *Cyp 51B*) y controlar la expresión de dichos genes.

El ADN o ARN puede amplificarse usando procedimientos rutinarios que se conocen en la técnica. En algunas realizaciones, la amplificación de ADN fúngico se realiza usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Véase, por ejemplo las Patentes de Estados Unidos Nº 4.683.195 y 4.683.202); reacción en cadena de la ligasa ("LCR") (Véase, por ejemplo Landegren et al., Science 247: 1077-1080 (1988); D.Y. Wu y R.B. Wallace, Genomics 4: 560-569 (1989); y F. Barany, PCR Methods Appl. 7: 5-16 (1991)); amplificación isotérmica mediada por bucles ("LAMP") (Nagamin et al., Clin. Chem. 47(9): 1742-1743 (2001); Notomi et al., Nucleic Acids Res. 28(12): E63 (2000)); análisis basado en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) (J. Compton, Nature 350: 91-92 (1991)); replicación de secuencia auto-sostenida ("3SR") (Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57: 1874-1878 (1990)); amplificación por desplazamiento de cadena ("SDA") (Walker et al., Nucleic Acids Res., 20: 1691-1696 (1992); y Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. SP: 392-396 (1992)); o amplificación mediada por transcripción ("TMA") (Pasternack et al., J. Clin. Microbiol. 35(3): 676-678 (1997)).

Un especialista en la técnica puede diseñar fácilmente cebadores específicos para amplificar un ácido nucleico que comprende la región de la deleción descubierta y el factor de transcripción AzRF1 generalmente. Los cebadores están diseñados normalmente para ser complementarios a secuencias en cualquier extremo de la secuencia a amplificar pero no complementarios a cualesquiera otras secuencias. El diseño de cebadores se describe en, por ejemplo, Sambrook et al., 2001, *supra*.

Los amplicones pueden detectarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo los descritos anteriormente. En una realización, un formato de sonda de hidrólisis (por ejemplo, TAQMAN) con un resto de unión al surco menor (MGB) puede usarse para detectar amplicones. En otra realización, puede usarse un colorante de cianina que se une a ADN de cadena doble. Los colorantes de cianina ejemplares incluyen, aunque no se limitan a, SYBR GREEN II, SYBR GOLD, YO (Amarillo de Oxazol), TO (Naranja de Tiazol) y PG (PicoGreen).

En otras realizaciones, la etapa de ensayo puede comprender realizar un análisis de curva de fusión. La inspección de diagramas de fluorescencia frente a temperatura al final de la PCR puede proporcionar información adicional cuando se usan ciertos colorantes o formatos de sonda. Por ejemplo, con el colorante SYBR Green, la pureza y la identidad de los productos de PCR pueden confirmarse a través de sus temperaturas de fusión. Análogamente, cuando se usan sondas de hibridación, las alteraciones de secuencia, incluyendo polimorfismos, pueden distinguirse mediante temperatura de fusión de la sonda.

En un ejemplo, inmediatamente después del último ciclo de PCR, las muestras se desnaturalizan a 90 ºC~95 ºC, se enfrían a aproximadamente 5 ºC-10 ºC por debajo del intervalo de T_m de interés y a continuación se calientan lentamente a una velocidad de aumento de temperatura que varía normalmente entre 0,1 y 0,4 ºC/segundo, mientras

la fluorescencia se monitoriza de forma continua. Se observa una notable disminución de la fluorescencia cuando se alcanza una temperatura a la cual, dependiendo de la química de fluorescencia particular, (a) una sonda se disocia del amplicón (en el caso de sondas de hibridación) o (b) el producto de PCR de cadena doble se disocia en ADN de cadena sencilla.

La transición de fusión no se produce toda de una vez sino que tiene lugar en un pequeño intervalo de temperaturas. El centro de la pendiente de la curva de fusión en el diagrama de fluorescencia frente a temperatura se denomina como la T_m. La temperatura de fusión o Tm es una medición de la estabilidad térmica de una cadena doble de ADN y depende de numerosos factores, incluyendo la longitud, el contenido de G/C y la posición relativa de cada tipo de nucleótido (A, T, G, C, etc.) (Wetmur, J. G. 1997. DNA Probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. Crit Rev Biochem Mol Biol. 26: 227-259). La temperatura de fusión depende además del número, la posición relativa y el tipo de emparejamientos erróneos de nucleótidos (A:A, A:G, G:T, G:A, etc.), que pueden producirse entre dúplex de ADN:ADN o Sonda:ADN (S. H. Ke y Wartell, R. 1993. Influence of nearest neighbor sequence on the stability of base pair mismatches in long DNA: determination by temperature-gradient gel electrophoresis. Nucleic Acids Res 21: 5137-5143). Es posible, por lo tanto, confirmar la presencia de un amplicón particular mediante la temperatura de fusión si se conocen el tamaño y la secuencia del producto diana. Del mismo modo, es posible diferenciar dos especies distintas en base a la temperatura de fusión diferencial debido a la variación de la secuencia. La viabilidad y la utilidad del análisis de la curva de fusión en sistemas de detección a base de PCR se conocen bien.

En una realización, la región de ADN fúngico que es específica para resistencia a triazol en *Aspergillus* se detecta usando una sonda de baliza molecular seleccionada entre el grupo constituido por la SEC ID Nº 7, la SEC ID Nº 8 y la SEC ID Nº 9. En otra realización, la región de ADN fúngico responsable de la resistencia a triazol en *Aspergillus* se amplifica usando los cebadores de las SEC ID Nº 3 y 4.

En algunas realizaciones, los procedimientos de detección de la invención comprenden además un control de amplificación interno.

Muestras

Puede usarse cualquier muestra adecuada. En una realización, se usa una muestra biológica. La muestra biológica puede obtenerse de o extraerse de cualquier organismo.

En un aspecto, se usa una muestra de fluido, tal como un fluido corporal. Las muestras ejemplares incluyen, aunque no se limitan a, orina, linfa, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, líquido pericárdico, humor víreo u otra muestra ocular, líquido pleural, fluido vaginal, moco, pus o líquido amniótico pero es preferiblemente sangre, plasma y suero. La muestra puede ser una muestra celular o de tejido, tal como pulmón, cerebro, hígado, piel o uñas.

En un ejemplo, una muestra es de origen humano, mientras que en otro se usan muestras no humanas. Por ejemplo, la muestra puede ser de animales criados con fines comerciales tales como caballos, vacas, ovejas o cerdos o de mascotas tales como gatos o perros. También pueden evaluarse muestras de plantas.

Los procedimientos también pueden realizarse en muestras no biológicas. La muestra no biológica puede ser un fluido o un sólido. Los ejemplos de muestras no biológicas incluyen, aunque no se limitan a, fluidos quirúrgicos, aire, suelo, agua, tal como agua potable, reactivos para ensayos de laboratorio y recipientes domésticos. Como alternativa, la muestra no biológica puede ser un dispositivo de recogida de partículas que contiene aire, agua, otro líquido o material.

En una realización, una muestra se procesa antes de someterla al ensayo, por ejemplo mediante centrifugado o mediante el paso a través de una membrana que elimina por filtración moléculas o células no deseadas, tales como glóbulos rojos. Como alternativa, una muestra puede amplificarse, por ejemplo mediante PCR, antes del ensayo. En algunos casos, una muestra se somete al ensayo inmediatamente o poco después del aislamiento, mientras que en otros una muestra se almacena, por ejemplo a por debajo -70 ºC, antes del ensayo.

Kits

En un aspecto, se proporcionan kits para detectar hongos resistentes a triazol en una muestra. En una realización, un kit comprende un oligonucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID Nº 5 ó 6 o una secuencia con más del 90 % de homología con la SEC ID Nº 5 ó 6. El oligonucleótido puede comprender un marcador, y el kit puede comprender además uno o más cebadores de amplificación. En otra realización, el kit comprende una sonda de baliza molecular que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID Nº 7, la SEC ID Nº 8 o la SEC ID Nº 9 y cebadores de amplificación que tienen las secuencia de ácido nucleico de la SEC ID Nº 3 y 4.

En otras realizaciones, los kits pueden comprender reactivos para extraer ADN o ARN fúngico de una muestra y/o cebadores que pueden usarse para amplificar la región de ADN fúngico y/o un control interno para las fases de amplificación y detección. El kit puede comprender adicionalmente uno o más reactivos o instrumentos que permitan realizar los procedimientos de la invención. Dichos reactivos o instrumentos incluyen, por ejemplo, uno o más de los siguientes: tampones adecuados (soluciones acuosas), medios para obtener una muestra del sujeto (tales como un

recipiente o un instrumento que comprende una aguja) o un soporte que comprende pocillos sobre el cual puede realizarse la reacción. Los reactivos pueden estar es un estado seco, de modo que una muestra de fluido resuspende los reactivos. El kit también puede comprender instrucciones para usar los reactivos para detectar la presencia de un hongo resistente a triazol.

Ejemplo 1

El genoma de *Aspergillus fumigatus* se inspeccionó usando una secuencia tac l p de *C. albicans* [ABD85289.1]. Ocho supuestos factores de transcripción Zn2Cyc6 se identificaron (figura 1). Los supuestos factores de transcripción Zn2Cyc6 se secuenciaron a partir de una cepa susceptible a triazol y una cepa resistente a triazol de *Aspergillus fumigatus* usando un secuenciador de ADN por electroforesis de capilaridad CEQ 8000 (Beckman coulter, Inc., Fullerton, CA).

Los ocho supuestos factores de transcripción (TF) de C6 se amplificaron a partir de una cepa resistente a itraconazol bien caracterizada que se sabe que sobre-expresa transportadores ABC. Nascimento et al. Antimicrob. Agents Chemother. (2003) 47: 1719-26. Los supuestos TF mutantes se introdujeron en una cepa receptora de tipo silvestre y los transformantes se cribaron en busca de resistencia a 10 μg/ml de itraconazol. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) fueron determinadas por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) procedimiento de microdilución M38-A en medio RPMI 1640 en presencia de 0,01 a 16,0 μg/ml después de 48 horas de cultivo a 37 ºC.

Se identificó un TF en la cepa mutante, llamado *AzRF1*, situado en el cromosoma 5 (número de GenBank XP 753953) que otorgaba fuerte resistencia a itraconazol (CIM > 16 μg/ml) y mostraba resistencia cruzada a voriconazol (CIM > 8,0 μg/ml). *AzRF1* es un factor de transcripción del C6 que está estrechamente relacionado con *Tac1* de *C. albicans* con el 35 % de identidad en la secuencia con las proteínas de *Tac1* (número de entrada en el GeneBank ABD85289.1).

El *AzRF1* mutante contiene una deleción de dos repeticiones de nucleótidos de CTCAGT en la posición 1675-1686 (número de entrada del Genbank XM 748860), que da como resultado la pérdida de cuatro aminoácidos (QSQS) en la posición 559-563. Véase la figura 2.

La introducción del alelo *AzRF1* mutante en la cepa de *A. fumigatus* de tipo silvestre ATCC 13073 otorgaba resistencia a itraconazol (CIM > 16,0 μg/ml) y resistencia cruzada a voriconazol (CIM > 8,0 μg/ml) (tabla 2). Para determinar si la resistencia a triazol mostrada por la cepa *AzRF1-M* dependía de la presencia del gen *AzRF1* mutante, el producto de PCR de AzRF1 de *A. fumigatus* se clonó en pRG3-AMA1-Bam HI, un plásmido de replicación autónoma (Tabla 1). El plásmido pRG3-AMA1-AzRF1 se transformó en la cepa Ku80 susceptible a triazol. El mutante *AzRF1-A* obtenido, que contenía el *AzRF1* mutante en un plásmido de replicación autónoma también era resistente a fármacos con triazol (tabla 2). La pérdida del plásmido pRG3-AMA1-AzRF1 se consiguió mediante 10 rondas de subcultivo en medio mínimo sin fármaco que dieron como resultado la cepa *AzRF1-R*. La pérdida del plásmido pRG3-AMA1-*AzRF1* en la cepa *AzRF1-R* se confirmó mediante PCR. La cepa *AzRF1-R* tenía sensibilidad restaurada a fármacos con triazol (tabla 2).

Las cepas parentales de *Aspergillus fumigatus*, los mutantes obtenidos y los plásmidos usados en este estudio se describen a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas y plásmidos usados en este estudio

Cepa / Plásmido ATCC 13073	**Genotipo / Descripción** cepa de *A. fumigatus* de tipo silvestre	**Fuente** ATCC
KY80 DELTA	pyrGAF::Delta KU80 de *A. fumigatus*: cepa de tipo silvestre sensible a fármacos con equinocandina	Da Silva et al., Eukaryot. Cell, 5: 207-11 (2006)
AzRF1-M	Mutante de *AzRF1* recombinante homólogo de ATCC 13073 formado después de la transformación con un producto de PCR de AzRF1 mutante	Este estudio
AzRF1-H	Mutante de *AzRF1* recombinante homólogo de KU80 formado después de la transformación con pRG3-(pyr4)-AMA1 cortado con Bam HI	Este estudio

(continuación)

Cepa / Plásmido ATCC 13073	**Genotipo / Descripción** cepa de *A. fumigatus* de tipo silvestre	**Fuente** ATCC
AzRF1-A	Mutante de *AzRF1* de KU80 transformado con el plásmido de replicación autónoma sin cortar pRG3-(pyr4)-*AMA1-AzRF1*: también contiene *AzRF1* de tipo silvestre	Este estudio
AzRF1-R	Cepa obtenida de *AzRF1-A* después de la retirada del plásmido	Este estudio
pRG3-AMA1	Contiene los genes *AMA1* y *pyr4* de *A. nidulans*	Aleksenko et al., Mol. Microbiol. (1996) 19: 565-74; Aleksenko et al., Fungal Genet. Biol. (1997) 21: 373-87; y Liu et al., Antimicrob. Agents Chemother. (2004) 48: 2490-6
pRG3-AMA1-*AzRF1*	Contiene el mutante fks1-*AzRF1* de *A. fumigatus* en pRG3-(pyr4)-AMA1	

Tabla 2: susceptibilidades antifúngicas a triazol de cepas parentales y mutantes obtenidos

Cepa	**CIM (μg/ml)**	
	ITRACONAZOL	**VORICONAZOL**
ATCC 13073	0,25	0,06
AzRF1-M	>16,0	>8,0
KU80 DELTA	0,25	0,06
AzRF1-H	>16,0	>8,0
AzRF1-A	>16,0	>8,0
AzRF1-R	>16,0	>8,0

Estos datos demuestran que una mutación en *AzRF1* otorga resistencia a fármacos con triazol en *A. fumigatus*. Este descubrimiento puede tener relevancia clínica como marcador para la resistencia a triazol en infecciones por *Aspergillus*.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de Aspergillus resistente a triazol en una muestra, que comprende

(A) evaluar dicha muestra en busca de la presencia de un gen que codifica un factor de transcripción AzRF1 (SEC ID Nº 2), en el que dicho factor de transcripción AzRF1 contiene una mutación de una deleción de los restos QSQS en la posición 559-562 y
(B) correlacionar la presencia de dicha mutación con la presencia dicho Aspergillus resistente a triazol.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la evaluación implica medir el nivel de expresión de dicho gen.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha evaluación comprende poner en contacto a dicha muestra con un oligonucleótido capaz de hibridar con dicho gen mutante.

4. El procedimiento de la reivindicación 3, que comprende además amplificar dicho gen mutante antes de dicha hibridación.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicha amplificación comprende PCR.

6. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicha amplificación comprende poner en contacto a la muestra con cebadores que tienen las secuencias de ácido nucleico de la SEC ID Nº 3 y la SEC ID Nº 4.

7. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho oligonucleótido comprende un marcador detectable.

8. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho oligonucleótido comprende un fluoróforo y un cromóforo.

9. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho oligonucleótido comprende un fluoróforo y un desactivador de fluorescencia no fluorescente.

10. El procedimiento de la reivindicación 3 ó 4, en el que dicho oligonucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID Nº 5 o la SEC ID Nº 6.

11. El procedimiento de la reivindicación 3 ó 4, en el que dicho oligonucleótido comprende más del 90 % de homología con la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID Nº 5 o la SEC ID Nº 6.

12. El procedimiento de la reivindicación 3 ó 4, en el que dicho oligonucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID Nº 7, la SEC ID Nº 8 o la SEC ID Nº 9.

13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el Aspergillus resistente a triazol es Aspergillus fumigatus.

14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el Aspergillus resistente a triazol es resistente a itraconazol, posaconazol, voriconazol, isavuconazol o ravuconazol.

15. Un kit para detectar Aspergillus resistente a triazol en una muestra, que comprende un oligonucleótido que tiene la secuencia SEC ID Nº 5 o la SEC ID Nº 6 o una secuencia con más del 90 % de homología con la SEC ID Nº 5 o la SEC ID Nº 6, en el que dicho oligonucleótido comprende preferiblemente un marcador y en el que dicho kit comprende preferiblemente además uno o más cebadores de amplificación.

Figura 1

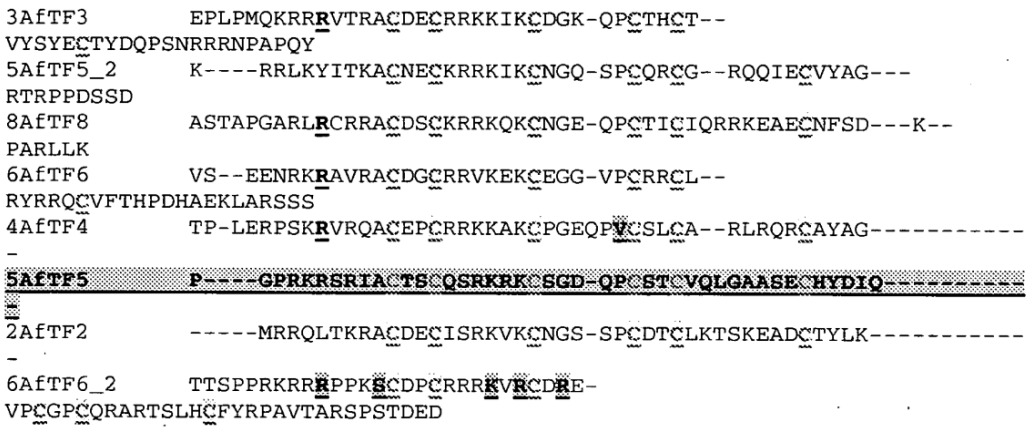
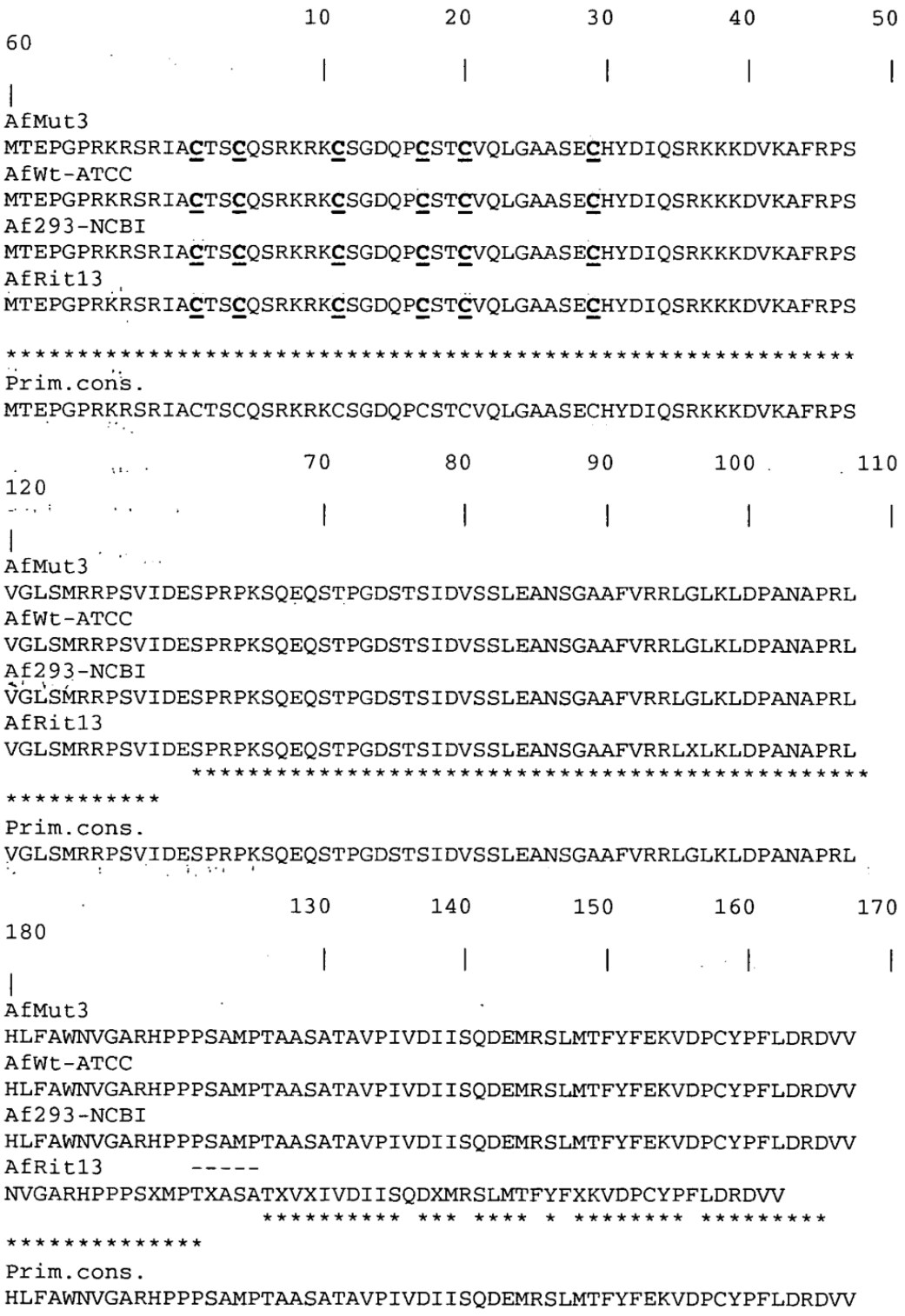

3AfTF3 EPLPMQKRRRVTRACDECRRKKIKCDGK-QPCTHCT--
VYSYECTYDQPSNRRRNPAPQY
5AfTF5_2 K----RRLKYITKACNECKRRKIKCNGQ-SPCQRCG--RQQIECVYAG---
RTRPPDSSD
8AfTF8 ASTAPGARLRCRRACDSCKRRKQKCNGE-QPCTICIQRRKEAECNFSD---K--
PARLLK
6AfTF6 VS--EENRKRAVRACDGCRRVKEKCEGG-VPCRRCL--
RYRRQCVFTHPDHAEKLARSSS
4AfTF4 TP-LERPSKRVRQACEPCRRKKAKCPGEQPVCSLCA--RLRQRCAYAG----------
-
5AfTF5 P----GPRKRSRIACTSCQSRKRKCSGD-QPCSTCVQLGAASECHYDIQ---------
-
2AfTF2 -----MRRQLTKRACDECISRKVKCNGS-SPCDTCLKTSKEADCTYLK----------
-
6AfTF6_2 TTSPPRKRRRPPKSCDPCRRRKVRCDRE-
VPCGPCQRARTSLHCFYRPAVTARSPSTDED

Figura 2


10 20 30 40 50
60
AfMut3
MTEPGPRKRSRIACTSCQSRKRKCSGDQPCSTCVQLGAASECHYDIQSRKKKDVKAFRPS
AfWt-ATCC
MTEPGPRKRSRIACTSCQSRKRKCSGDQPCSTCVQLGAASECHYDIQSRKKKDVKAFRPS
Af293-NCBI
MTEPGPRKRSRIACTSCQSRKRKCSGDQPCSTCVQLGAASECHYDIQSRKKKDVKAFRPS
AfRit13
MTEPGPRKRSRIACTSCQSRKRKCSGDQPCSTCVQLGAASECHYDIQSRKKKDVKAFRPS
Prim.cons.
MTEPGPRKRSRIACTSCQSRKRKCSGDQPCSTCVQLGAASECHYDIQSRKKKDVKAFRPS
70 80 90 100 110
120
AfMut3
VGLSMRRPSVIDESPRPKSQEQSTPGDSTSIDVSSLEANSGAAFVRRLGLKLDPANAPRL
AfWt-ATCC
VGLSMRRPSVIDESPRPKSQEQSTPGDSTSIDVSSLEANSGAAFVRRLGLKLDPANAPRL
Af293-NCBI
VGLSMRRPSVIDESPRPKSQEQSTPGDSTSIDVSSLEANSGAAFVRRLGLKLDPANAPRL
AfRit13
VGLSMRRPSVIDESPRPKSQEQSTPGDSTSIDVSSLEANSGAAFVRRLXLKLDPANAPRL
Prim.cons.
VGLSMRRPSVIDESPRPKSQEQSTPGDSTSIDVSSLEANSGAAFVRRLGLKLDPANAPRL
130 140 150 160 170
180
AfMut3
HLFAWNVGARHPPPSAMPTAASATAVPIVDIISQDEMRSLMTFYFEKVDPCYPFLDRDVV
AfWt-ATCC
HLFAWNVGARHPPPSAMPTAASATAVPIVDIISQDEMRSLMTFYFEKVDPCYPFLDRDVV
Af293-NCBI
HLFAWNVGARHPPPSAMPTAASATAVPIVDIISQDEMRSLMTFYFEKVDPCYPFLDRDVV
AfRit13
NVGARHPPPSXMPTXASATXVXIVDIISQDXMRSLMTFYFXKVDPCYPFLDRDVV
Prim.cons.
HLFAWNVGARHPPPSAMPTAASATAVPIVDIISQDEMRSLMTFYFEKVDPCYPFLDRDVV

```
                    190       200       210       220       230
240
                      |         |         |         |         |
|
AfMut3
LRQVSRRWLPSSSESALPYGPYDAVLCGIAALGFLFSRRRAVPAEYRVAETARRILEHGL
AfWt-ATCC
LRQVSRRWLPSSSESALPYGPYDAVLCGIAALGFLFSRRRAVPAEYRVAETARRILEHGL
Af293-NCBI
LRQVSRRWLPSSSESALPYGPYDAVLCGIAALGFLFSRRRAVPAEYRVAETARRILEHGL
AfRit13      LRQVSRRWLPSSSESALPYGPY-----------------------------------
-
             **********************
Prim.cons.
LRQVSRRWLPSSSESALPYGPYDAVLCGIAALGFLFSRRRAVPAEYRVAETARRILEHGL

                    250       260       270       280       290
300
                      |         |         |         |         |
|
AfMut3
LVDTPASVDIVTGWVLRVAYLRMTASPHVAWMASCTLMHLIEASGLHLEPLPETSLSQTT
AfWt-ATCC
LVDTPASVDIVTGWVLRVAYLRMTASPHVAWMASCTLMHLIEASGLHLEPLPETSLSQTT
Af293-NCBI
LVDTPASVDIVTGWVLRVAYLRMTASPHVAWMASCTLMHLIEASGLHLEPLPETSLGQTT
AfRit13      -------------------------------------------------------
-

Prim.cons.
LVDTPASVDIVTGWVLRVAYLRMTASPHVAWMASCTLMHLIEASGLHLEPLPETSLSQTT

                    310       320       330       340       350
360
                      |         |         |         |         |
|
AfMut3
TPCAPEIRRRLFGMARHLNVWISFELGRSRVVLHGATSLPPAPRSPNSPSEIFNLLPVSE
AfWt-ATCC
TPCAPEIRRRLFGMARHLNVWISFELGRSRVVLHGATSLPPAPRSPNSPSEIFNLLPVSE
Af293-NCBI
TPCAPEIRRRLFGMARHLNVWISFELGRSRVVLHGATSLPPAPRSPNSPSEIFNLLPVSE
Rit13        -----------------------------------
TSLPPAPRSPNSPSEIFNLLPVSE

************************
Prim.cons.
TPCAPEIRRRLFGMARHLNVWISFELGRSRVVLHGATSLPPAPRSPNSPSEIFNLLPVSE
```

```
                    370        380        390        400        410
420
                      |        |          |          |          |
|
AfMut3
SLDPKQTQDARGLESTLAAVLDVIHVQPPLILAQCNLMLCLYRRLRALNSSISGELLDRA
AfWt-ATCC
SLDPKQTQDARGLESTLAAVLDVIHVQPPLILAQCNLMLCLYRRLRALNSSISGELLDRA
Af293-NCBI
SLDPKQTQDARGLESTLAAVLDVIHVQPPLILAQCNLMLCLYRRLRALNSSISGELLDRA
Rit13
SLDPKQTQDARGXESTLAAVLDVIHVQPPLILAQCNLMLCLYRRLRALNSSISGELLDRA
              ************
*********************************************
Prim.cons.
SLDPKQTQDARGLESTLAAVLDVIHVQPPLILAQCNLMLCLYRRLRALNSSISGELLDRA


                    430        440        450        460        470
480
                      |          |          |          |          |
|
AfMut3
LALAGTGLRAAREMVASVCPWHQIANVPFQIVCTLLAIDSRASLALLGEAMRTLREVAAA
AfWt-ATCC
LALAGTGLRAAREMVASVCPWHQIANVPFQIVCTLLAIDSRASLALLGEAMRTLREVAAA
Af293-NCBI
LALAGTGLRAAREMVASVCPWHQIANVPFQIVCTLLAIDSRASLALLGEAMRTLREVAAA
AfRit13
LALAGTGLRAAREMVASVCPWHQIANVPFQIVCTLLAIDSRASLALLGEAMRTLREVAAA

************************************************************
Prim.cons.
LALAGTGLRAAREMVASVCPWHQIANVPFQIVCTLLAIDSRASLALLGEAMRTLREVAAA


                    490        500        510        520        530
540
                      |          |          |          |          |
|
AfMut3
YDTEVMREAYSTAYLLILLHQRRKEEDTRALRDVLRVNANAAAAAAPPVSVDAAARGATS
AfWt-ATCC
YDTEVMREAYSTAYLLILLHQRRKEEDTRALRDVLRVNANAAAAAAPPVSVDAAARGATS
Af293-NCBI
YDTEVMREAYSTAYLLILLHQRRKEEDTRALRDVLRVNANAAAAAAPPVSVDAAARGATS
AfRit13
YDTEVMREAYSTAYLLILLHQRRKEEDTRALRDLLRVNANAAAAAAPPVSVDAAARGATS

*********************************:**************************
Prim.cons.
YDTEVMREAYSTAYLLILLHQRRKEEDTRALRDVLRVNANAAAAAAPPVSVDAAARGATS
```

```
                    550        560        570        580        590
600
                      |          |          |          |          |
|
AfMut3        SVQRQAPPPPQSQSQSQS----
HSVADRSEMSWLGDLMIDMPSLQNFDLDQFLMTDVPWP
AfWt-ATCC     SVQRQAPPPPQSQSQSQS----
HSVADRSEMSWLGDLMIDMPSLQNFDLDQFLMTDVPWP
Af293-NCBI
SVQRQAPPPPQSQSQSQSQSQSHSVADRSEMSWLGDLMIDMPSLQNFDLDQFLMTDVPWP
AfRit13
SVQRQAPPPPQSQSQSQSQSQSHSVADRSEMSWLGDLMIDMPSLQNFDLDQFLMTDVPWP
AfKU80
SVQRQAPPPPQSQSQSQSQSQSHSVADRSEMSWLGDLMIDMPSLQNFDLDQFLMTDVPWP
              ******************
************************************
Prim.cons.
SVQRQAPPPPQSQSQSQSQSQSHSVADRSEMSWLGDLMIDMPSLQNFDLDQFLMTDVPWP


AfMut3        LPEMGI
AfWt-ATCC     LPEMGI
Af293-NCBI    LPEMGI
AfRit13       LPEMGI
              ******
Prim.cons.    LPEMGI
```

Figura 3

ATGACTGAGCCAGGGCCGCGAAAGCGCTCCAGAATCGCCTGCACATCATGCCAGTCGCGCAAACGGAAGTGC
TCCGGTGACCAACCATGCAGCACCTGTGTACAGTTGGGGGCAGCCTCCGAGTGTCATTACGACATCCAATCT
CGCAAAAAGAAAGATGTCAAGGCATTTCGGCCATCAGTCGGTCTGTCGATGCGTAGACCTAGTGTCATCGAC
GAGTCCCCTCGGCCGAAGAGCCAGGAGCAGTCGACACCCGGGGACTCGACAAGCATCGACGTCAGTTCTCTC
GAGGCCAATTCGGGTGCAGCGTTTGTGCGCAGATTAGGCCTCAAGCTGGACCCAGCCAATGCGCCGAGATTG
CATCTTTTCGCCTGGAACGTCGGGGCTCGTCACCCGCCACCCTCGGCCATGCCTACGGCGGCCTCGGCCACG
GCCGTGCCGATCGTGGACATCATCTCCCAAGACGAGATGCGATCGTTGATGACATTCTACTTTGAGAAAGTC
GATCCGTGCTACCCATTTCTTGACCGTGATGTGGTACTCCGCCAGGTCAGTAGGCGATGGCTGCCTTCCTCG
TCCGAGTCGGCCCTGCCATACGGGCCCTACGATGCGGTACTCTGCGGCATAGCGGCGCTGGGATTTCTCTTC
TCACGACGACGAGCCGTCCCCGCAGAGTACCGGGTGGCCGAAACCGCTCGACGCATCCTTGAGCATGGTCTG
CTCGTCGACACCCCCGCGTCGGTGGACATCGTCACCGGCTGGGTGCTGCGAGTCGCGTACCTGCGCATGACA
GCATCCCCCCATGTTGCCTGGATGGCCAGCTGCACACTGATGCACCTCATCGAGGCATCGGGTCTCCATCTC
GAGCCCTTGCCAGAGACCTCCCTCGGCCAGACAACGACGCCCTGCGCCCCAGAAATCCGCCGCCGGCTCTTC
GGCATGGCCCGCCACCTGAACGTGTGGATCTCCTTCGAGCTCGGCCGGTCCCGAGTCGTCCTGCACGGCGCA
ACCTCCCTCCCACCCGCGCCCCGATCGCCCAACAGCCCTTCGGAGATCTTCAATCTCCTCCCCGTCTCGGAA
AGCCTCGACCCGAAACAAACCCAAGACGCGCGCGGCCTGGAATCCACCCTCGCCGCCGTCCTCGACGTCATC
CACGTCCAACCACCCCTCATCCTCGCGCAGTGCAACCTCATGCTCTGCCTGTACCGGCGCCTCCGCGCCCTC
AACTCCAGCATCTCCGGCGAGCTGCTCGACCGCGCCCTCGCCCTGGCGGGCACCGGCCTGCGCGCCGCCCGC
GAAATGGTCGCCTCCGTCTGCCCCTGGCACCAGATCGCCAACGTCCCCTTCCAGATCGTCTGCACCTTGCTT
GCAATCGACAGCCGCGCCTCGCTCGCCCTCCTGGGGGGAAGCAATGCGCACCCTCCGCGAGGTCGCCGCCGCC
TACGACACCGAGGTCATGCGCGAAGCCTACAGCACCGCCTACCTGCTCATTCTGCTGCATCAGCGCCGCAAG
GAAGAAGACACGCGGGCGCTCCGCGATGTTCTCCGCGTGAATGCCAACGCGGCCGCCGCCGCGGCGCCGCCG
GTTAGCGTCGATGCTGCAGCGAGAGGGGCTACCTCCTCGGTGCAGCGGCAGGCGCCGCCGCCACCGCAGTCT
CAGTCTCAGTCTCAGTCTCAGTCTCAGTCTCATTCTGTGGCCGACCGCTCGGAGATGTCCTGGTTGGGCGAT
CTGATGATCGACATGCCGAGTTTGCAGAATTTCGATCTTGATCAGTTCCTGATGACGGATGTGCCGTGGCCG
CTGCCGGAGATGGGGATTTGA

Figura 4

MTEPGPRKRSRIACTSCQSRKRKCSGDQPCSTCVQLGAASECHYDIQSRKKKDVKAFRPSVGLSMRRPSVID
ESPRPKSQEQSTPGDSTSIDVSSLEANSGAAFVRRLGLKLDPANAPRLHLFAWNVGARHPPPSAMPTAASAT
AVPIVDIISQDEMRSLMTFYFEKVDPCYPFLDRDVVLRQVSRRWLPSSSESALPYGPYDAVLCGIAALGFLF
SRRRAVPAEYRVAETARRILEHGLLVDTPASVDIVTGWVLRVAYLRMTASPHVAWMASCTLMHLIEASGLHL
EPLPETSLGQTTTPCAPEIRRRLFGMARHLNVWISFELGRSRVVLHGATSLPPAPRSPNSPSEIFNLLPVSE
SLDPKQTQDARGLESTLAAVLDVIHVQPPLILAQCNLMLCLYRRLRALNSSISGELLDRALALAGTGLRAAR
EMVASVCPWHQIANVPFQIVCTLLAIDSRASLALLGEAMRTLREVAAAYDTEVMREAYSTAYLLILLHQRRK
EEDTRALRDVLRVNANAAAAAAPPVSVDAAARGATSSVQRQAPPPPQSQSQSQS**QSQS**HSVADRSEMSWLGD
LMIDMPSLQNFDLDQFLMTDVPWPLPEMGI