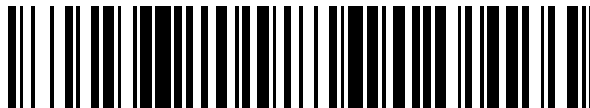


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 351**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2009 E 09757698 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2288731**

54 Título: **Método para la identificación electroquímica de secuencias diana de nucleótidos**

30 Prioridad:

05.06.2008 FR 0803143

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.12.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (50.0%)
5, rue Thomas Mann
75205 Paris Cedex 13 , FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LIMOGES, BENOÎT;
DEFEVER, THIBAUT y
MARCHAL, DAMIEN**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 524 351 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la identificación electroquímica de secuencias diana de nucleótidos

La presente invención se refiere a un método y a un sistema de identificación electroquímica de secuencias diana de nucleótidos.

- 5 Un campo de aplicación a considerarse principalmente el análisis rápido de muestras biológicas susceptibles de contener bacterias o virus, y más generalmente cualquier ácido nucleico.

Los métodos de detección electroquímica ya conocidos permiten poner en evidencia secuencias diana de ácidos nucleicos. Algunos de ellos utilizan a la vez procesos de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo tipo "PCR" (Polymerase Chain Reaction en inglés), y procesos de voltamperometría cíclica. Según uno de dichos métodos, se proporciona una muestra biológica que contiene un ácido nucleico que incluye una secuencia diana de nucleótidos determinada y se le añade a la muestra biológica un agente oxidante apto para oxidar al menos una de las bases nucleotídicas de la secuencia diana. Los medios de amplificación comprenden nucleótidos de un tipo que incluye la base nucleotídica oxidable y los nucleótidos están destinados, evidentemente, a ser consumidos durante la realización del proceso de amplificación con el fin de producir secuencias de ácidos nucleicos replicados. Simultáneamente, o después de cada etapa de amplificación, se aplica un campo eléctrico a la muestra para provocar la reacción del agente oxidante con la base nucleotídica oxidable y se mide la corriente eléctrica que atraviesa así la muestra. Según este método, descrito más particularmente en el documento PCT/FR2007/000373, se determina la presencia de la secuencia diana relevante así como su cantidad inicial cuando la corriente eléctrica disminuye durante las amplificaciones. En efecto, durante el proceso de amplificación, la cantidad de nucleótidos libres de los medios de amplificación disminuye, ya que se incorporan a los ácidos nucleicos sintetizados. Entonces, el agente oxidante sólo puede reaccionar con una cantidad cada vez más limitada de nucleótidos libres. Por tanto, se producen cada vez menos transferencias electrónicas debidas a la reacción de oxidación, lo que disminuye la corriente eléctrica.

Así, este método permite detectar y cuantificar rápidamente la presencia de un ácido nucleico dado en una muestra biológica cualquiera.

- 25 Un problema que se presenta y que pretende resolver la presente invención es no sólo proporcionar otro método de detección electroquímico que permita detectar la presencia de una secuencia diana de nucleótidos en una muestra biológica, sino también poder identificar su naturaleza y cuantificarla.

Con el objetivo de resolver dicho problema, según un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de identificación electroquímico de secuencias diana de nucleótidos. Dicho método, del tipo donde se proporciona una muestra biológica susceptible de contener una secuencia diana de nucleótidos determinada y medios de amplificación activables que comprenden nucleótidos libres, puede provocar la replicación de dicha secuencia diana de nucleótidos determinada y la formación de secuencias diana de nucleótidos replicadas. Según el método, se proporciona también un compuesto oxido-reducible apto para reaccionar con dichos nucleótidos, poniéndose en contacto dicho compuesto oxido-reducible con dicha muestra biológica. Se activan entonces los medios de amplificación activables y se aplica un campo eléctrico a la muestra para activar el compuesto oxido-reducible, midiéndose la corriente eléctrica que atraviesa dicha muestra, que representa la actividad electroquímica del compuesto. De este modo se determina la presencia de la secuencia diana de nucleótidos determinada cuando disminuye la corriente eléctrica. Según la invención, se proporciona un compuesto oxido-reducible apto para intercalarse durante la replicación entre los nucleótidos que forman dichas secuencias diana replicadas, donde dichas secuencias diana replicadas provocan la inhibición de la actividad electroquímica de dicho compuesto oxido-reducible intercalado, disminuyendo con ello la corriente eléctrica.

Además de los nucleótidos libres, los medios de amplificación activables comprenden iniciadores que son ácidos oligonucleotídicos específicos y complementarios de la secuencia diana de nucleótidos a detectar y una polimerasa. Por otra parte, tal como se explicará a continuación detalladamente, se aplica el campo eléctrico a dicha muestra poniendo en contacto ésta con electrodos y aplicando una diferencia de potencial entre los electrodos.

- 45 Así, una característica de la invención es que proporciona un compuesto oxido-reducible que no va oxidar las bases nucleotídicas de los nucleótidos libres en la muestra, tal como es el caso en el documento de la técnica antes citado, sino que va a intercalarse entre los nucleótidos que forman las secuencias diana replicadas.

Preferentemente, se activan dichos medios de amplificación activables según ciclos de amplificación sucesivos y en cada ciclo de amplificación se duplica dicha secuencia diana replicada. El compuesto oxido-reducible se intercala entonces entre los nucleótidos que forman dichas secuencias diana replicadas y pierde su actividad oxido-reductible debido al campo eléctrico aplicado. Por tanto, durante los ciclos de amplificación, la señal eléctrica medida disminuye.

Ventajosamente, se registra entonces el número de ciclos de amplificación correspondiente a la disminución de la corriente eléctrica para determinar la concentración de dicha secuencia diana de nucleótidos en la muestra. En efecto, la disminución de la señal medida es proporcional a la cantidad de secuencias diana de nucleótidos replicada. Gracias a esta proporcionalidad, es posible deducir la cantidad de secuencia diana de nucleótidos presente inicialmente en la

muestra. De este modo, se repite la activación de dichos medios de amplificación activables siguiendo cierto número de ciclos de amplificación, registrándose el número de ciclos de dichos medios de amplificación cuando la corriente eléctrica disminuye con el fin de determinar la concentración de la secuencia diana de nucleótidos en la muestra. En efecto, cuanto más secuencias diana de nucleótidos contiene la muestra biológica, menor será el número de ciclos de amplificación necesarios para que disminuya la intensidad de corriente eléctrica. Y a la inversa, cuanto menos secuencias diana contiene la muestra, mayor será el número de ciclos de amplificación. Así, como se explicará detalladamente a continuación, dicho método permite igualmente cuantificar la concentración de una secuencia diana determinada en el interior de la muestra biológica.

Se señala que "compuesto oxido-reducible" se refiere no solamente a los compuestos red-ox, sino también a compuestos aptos para oxidarse en ciertas condiciones y en otras aptos para reducirse.

Según una forma de realización de la invención particularmente ventajosa, una vez que la secuencia diana de nucleótidos ha sido amplificada, se provee además de energía térmica a la muestra para provocar la liberación de dicho compuesto oxido-reducible intercalado, aplicándose un campo eléctrico a la muestra para registrar simultáneamente las variaciones de la corriente eléctrica que la atraviesa. Se determina entonces la energía térmica Q correspondiente a las variaciones máximas de la corriente eléctrica registradas para identificar la naturaleza de la secuencia diana de nucleótidos. Ventajosamente, se provee energía térmica a dicha muestra de modo que se provoca un aumento progresivo de su temperatura. Así, se registran las variaciones de corriente eléctrica en función de la energía térmica cedida, o más concretamente de la temperatura en un intervalo dado. A partir de la variación máxima de la corriente eléctrica a una temperatura dada, se identifica la naturaleza de la secuencia diana de nucleótidos. En efecto, según la naturaleza de la secuencia diana amplificada, la variación máxima de la corriente eléctrica a una temperatura dada es característica de dicha secuencia diana de nucleótidos replicada.

De este modo, cuando se proporciona suficiente energía térmica a la muestra y por tanto a las secuencias diana de nucleótidos replicadas, las dobles cadenas de las secuencias diana replicadas tienden a separarse en dos monocadenas y a liberar así el compuesto oxido-reducible intercalado, que recupera entonces su actividad electroquímica. Las dobles cadenas de las secuencias diana de nucleótidos replicadas se separan unas de otras para una agitación térmica dada, es decir a una temperatura dada, de modo que la liberación del compuesto oxido-reducible, que se mide entonces por la corriente eléctrica generada en los electrodos, interviene bruscamente, de un modo casi discreto, es decir, en un rango de temperaturas reducido, cuando una cantidad determinada de energía térmica es cedida a la muestra.

Ventajosamente, se provee energía térmica a dicha muestra de modo que se provoca un aumento progresivo de su temperatura, por ejemplo de entre 40°C y 98°C. En esta rango de temperaturas, las dobles cadenas de la secuencia diana de nucleótidos replicada van a evolucionar progresivamente desde un estado acoplado, donde cada una de las bases nucleotídicas de las secuencias diana replicadas están asociadas de modo complementario, hacia un estado disociado, donde cada secuencia diana replicada terminará siendo monocadena. El paso de un estado de doble cadena a un estado monocadena se produce así en un intervalo reducido de temperaturas, caracterizado por una temperatura denominada de disociación, generalmente indicada como Tm, característica de la naturaleza de la secuencia diana de nucleótidos replicada.

Preferentemente además, se mide la corriente eléctrica representativa de la actividad electroquímica de dicho compuesto oxido-reducible a una temperatura predeterminada de dicha muestra a la cual ninguna otra molécula formada o en curso de formación inhibe el compuesto oxido-reducible, por ejemplo dímeros de inicio. Ventajosamente, esta temperatura predeterminada es ligeramente inferior pero próxima a la temperatura de la muestra correspondiente a la cantidad de energía térmica Q determinada, de modo que, a esa temperatura elevada, todas las demás moléculas, de menor tamaño que la secuencia diana de nucleótidos replicada, son deshibridadas, mientras que la secuencia diana de nucleótidos replicada permanece intacta. De esta forma, de la corriente eléctrica medida se elimina la cantidad de corriente proveniente de la liberación de dicho compuesto oxido-reducible por los diversos dímeros de inicio o de todas las demás moléculas más pequeñas que la energía térmica ya producida permitió disociar.

Preferentemente, se utiliza la voltamperometría para medir y registrar la corriente eléctrica o tales variaciones de corriente eléctrica. Este método potencio-dinámico consiste en aplicar entre dos electrodos, como se explicará más detalladamente a continuación, un potencial variable con el tiempo y en registrar de forma concomitante la variación de corriente resultante. Se utiliza preferentemente una voltamperometría de onda cuadrada. Evidentemente son potencialmente aplicables otras técnicas electroquímicas, por ejemplo voltamperometría de impulso diferencial o voltamperometría de barrido lineal o cíclico o también voltamperometría de corriente de muestra y voltamperometría de corriente alternada.

Según una forma de realización particularmente ventajosa de la invención, el citado compuesto oxido-reducible producido es un complejo de un metal de transición, por ejemplo un metal de la columna VIIIA de la Tabla de Mendeleiev, y más precisamente osmio. Además, el compuesto oxido-reducible presenta ventajosamente al menos un ligando intercalador de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo un ligando dipiridofenazina, adecuado para intercalarse entre las cadenas acopladas formadas por las secuencias diana de nucleótidos replicadas.

Además, el compuesto oxido-reducible presenta al menos un ligando bipyridina y ventajosamente dos ligandos de este tipo. A continuación, se describirá más en detalle un complejo de osmio con un ligando dipiridofenazina y con dos ligandos bipyridina. Se observará, por otra parte, que ciertos compuestos oxido-reducibles totalmente orgánicos también pueden ser empleados provechosamente, como es el caso, por ejemplo, del azul de metileno.

- 5 Según una forma de realización preferente de la invención, se provoca la replicación de dicha secuencia diana de nucleótidos determinada y la formación de secuencias diana de nucleótidos replicadas en forma de dobles cadenas de ácidos nucleicos. Dichos medios de amplificación activables son de tipo PCR.

Según un segundo aspecto, la presente invención proporciona un sistema de identificación electroquímica de secuencias diana de nucleótidos. Dicho sistema comprende medios para recibir una muestra biológica susceptible de
10 contener una secuencia diana de nucleótidos determinada y medios de amplificación activables que comprenden nucleótidos libres para provocar la replicación de dicha secuencia diana de nucleótidos determinada y la formación de secuencias diana de nucleótidos replicadas. Además, el sistema incluye un compuesto oxido-reducible apto para reaccionar frente a dichos nucleótidos al estar en contacto el compuesto oxido-reducible con dicha muestra biológica. Los medios de activación permiten activar los medios de amplificación activables y otros medios permiten aplicar un
15 campo eléctrico a la muestra con el fin de activar dicho compuesto oxido-reducible, mientras que medios de medida permiten medir la corriente eléctrica que atraviesa dicha muestra, representativa de la actividad electroquímica de dicho compuesto oxido-reducible. Finalmente, unos medios de determinación permiten determinar la presencia de la secuencia diana de nucleótidos determinada cuando la corriente eléctrica disminuye. Según la invención, el compuesto oxido-reducible se selecciona de entre compuestos aptos para intercalarse durante la replicación entre los nucleótidos
20 que forman dichas secuencias diana replicadas, es decir, en las dobles cadenas de la secuencia diana de nucleótidos replicada, provocando dichas secuencias diana replicadas la inhibición de la actividad electroquímica del compuesto oxido-reducible intercalado, con lo que disminuye la corriente eléctrica.

Además, y según una forma de realización ventajosa, el sistema de identificación comprende además medios para proveer energía térmica a dicha muestra con el fin de provocar la liberación del compuesto oxido-reducible intercalado y
25 medios para aplicar un campo eléctrico a la muestra, gracias a electrodos en contacto con la muestra, de modo que se registran simultáneamente, en función de la temperatura, las variaciones de la corriente eléctrica que atraviesa la muestra; y también medios para determinar la cantidad de energía térmica correspondiente a las variaciones máximas de la corriente eléctrica registradas para controlar la presencia de la secuencia diana de nucleótidos determinada. Estos medios determinan, a partir de la variación máxima de la corriente eléctrica registrada, la temperatura de disociación T_m
30 característica de la presencia de una secuencia diana de nucleótidos a detectar. Se explicará más detalladamente a continuación, el sistema de identificación electroquímico citado anteriormente que permite emplear el método según la invención. En particular, se describirán los medios de activación, los cuales están ventajosamente adaptados para activar dichos medios de amplificación activables según ciclos de amplificación sucesivos para duplicar dicha secuencia diana replicada en cada ciclo de amplificación. Además, el sistema de identificación según la invención comprende
35 medios de registro para registrar el número de ciclos de amplificación correspondiente a la disminución de la corriente eléctrica con el fin de determinar la concentración de la secuencia diana de nucleótidos en la muestra.

Además, otras particularidades y ventajas de la invención surgirán con la lectura de la descripción siguiente de una forma de realización particular de la invención, dada a título ilustrativo pero no limitativo, con referencia a las figuras adjuntas, en las cuales:

- 40 Fig. 1: una vista esquemática de un sistema de identificación electroquímica según la invención;
Fig. 2A-2C: vistas esquemáticas de un elemento del sistema de identificación representado en la Fig. 1 según una variante de realización;
Fig. 3A y 3B: diagramas intensidad/potencial obtenidos con el sistema de identificación representado en la Fig. 1;
Fig. 3C: vista de un diagrama obtenido por deducción de los diagramas representados en las Fig. 3A y 3B;
45 Fig. 4: vista de un diagrama de un tipo análogo al de la Fig. 3C;
Fig. 5A: un diagrama intensidad/temperatura obtenido con el sistema de identificación representado en la Fig. 1 y en una primera etapa;
Fig. 5B: un diagrama obtenido en una segunda etapa por transposición del diagrama mostrado en la Fig. 5A;
Fig. 6: un diagrama del tipo representado en la Fig. 5B en una aplicación particular.

50 El método de identificación electroquímica según la invención requiere el empleo de un sistema de identificación electroquímica que comprende, por una parte, medios de control y de medida que se describirán en un primer momento y, por otra parte, constituyentes biológicos y químicos específicos. Así, en la Fig. 1 se representa de modo esquemático una instalación de identificación electroquímica 10 según la invención. Dicha Fig. 1 muestra dos micro-cubetas 12, 14 adaptadas para recibir en su interior una muestra biológica cuyas características se describirán más adelante. Estas
55 micro-cubetas 12, 14, ya conocidas en la técnica anterior, presentan respectivamente un fondo 16, 18 en el cual se disponen un electrodo 20, un contra-electrodo 22 y un electrodo de referencia, no representado, obtenidos por ejemplo por serigrafía, y respectivamente conectados a un potencióstato 24, los dos primeros mediante cables conductores 26, 28. Además, éstos están dispuestos en sándwich entre un módulo de efecto Pelletier 32 que los sostiene y una tapa térmica 30 unidos a un generador 34. Tal como se explicará más adelante, el módulo de efecto Pelletier 32 permite
60 ceder una cantidad de energía térmica dada al contenido de las micro-cubetas 12, 14. Por otra parte, el generador 34 y

el potencióstato 24 están controlados por un micro-ordenador 36 que contiene un programa de ordenador y medios de registro.

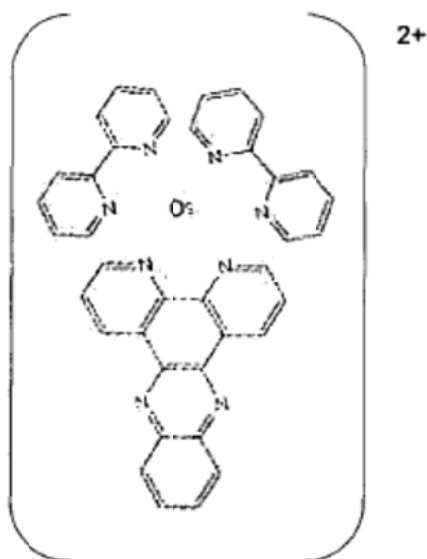
De este modo, las micro-cubetas 12, 14 constituyen medios de recepción aptos para recibir una muestra biológica; dicha muestra biológica es susceptible de incluir una secuencia de ácido nucleico, principalmente ADN, el cual encierra una secuencia diana de nucleótidos determinada a detectar. Además, el módulo de efecto Pelletier 32 y el generador 34 apto para ser controlado por el micro-ordenador 36 constituyen una primera parte de medios de amplificación activables, estando la segunda parte constituida por material biológico y compuestos químicos.

Evidentemente, otros medios de recepción bien conocidos, no representados, comprenden un tubo en cuyo casquillo se dispone la muestra biológica. Se equipa entonces el casquillo con electrodos aptos para sumergirse en dicha muestra biológica y para conectarse al potencióstato. El tubo está entonces destinado a ser instalado en un termo-ciclador para llevar a las muestras a temperaturas predeterminadas y según ciclos de tiempo predefinidos. Otros medios de recepción, ilustrados en las Fig. 2A a 2C, permiten recibir muestras biológicas. Comprenden un recipiente 11 de pequeñas dimensiones, por ejemplo un tapón de tubo, representado en la Fig. 2A, con una capacidad de 1 µl a 1 ml por ejemplo, y abierto en la parte superior 13. Dicho recipiente puede recibir la mezcla reactiva. Se cierra herméticamente mediante una película 15 sobre la cual se han serigrafiado tres electrodos separados 17, 19, 21. Los electrodos 17, 19, 21 están orientados hacia el interior del recipiente 11 y vuelven a salir del mismo en la junta entre el borde del recipiente y la película 15. A continuación, el recipiente 11, provisto con su película 15, se da vuelta y se apoya en un módulo de efecto Pelletier y, al salir, la mezcla reactiva inicialmente en el fondo del recipiente 11 entra en contacto con los electrodos 17, 19, 21 que se encuentran sumergidos en ella.

El método de amplificación aquí utilizado es el método denominado PCR. También, gracias al módulo de efecto Pelletier 32, el interior de las micro-cubetas 12, 14 está adaptado para alcanzar temperaturas determinadas durante tiempos también determinados y según el protocolo siguiente: el protocolo se inicia con un nivel preliminar de 1 a 15 minutos, según el tipo de polimerasa, llevándose el interior de las micro-cubetas 12, 14 a una temperatura de 94-95°C; a continuación, se aplica un cierto número de ciclos consecutivos de temperatura, en función de la amplificación necesaria para detectar la secuencia diana de nucleótidos replicada, clásicamente entre 10 y 50 ciclos, a las micro-cubetas 12, 14, según cuatro niveles sucesivos por ciclo, un primer nivel denominado de desnaturalización, clásicamente de 1 a 60 segundos a una temperatura de 94-95°C; un segundo nivel denominado de acoplamiento de los iniciadores, clásicamente de 1 a 60 segundos a una temperatura comprendida entre 40°C y 72°C, característica de los iniciadores específicos de la secuencia diana de nucleótidos determinada; un tercer nivel denominado de elongación, clásicamente de 1 a 60 segundos a 72°C, y un último nivel de pocos segundos a una temperatura comprendida entre 40°C y 95°C, determinada por el tiempo necesario para la medida electroquímica. Se explicarán a continuación las condiciones de realización de esta primera parte de medios de amplificación después de haber descrito la segunda parte que comprende principalmente material biológico y compuestos químicos.

Como uno de los objetivos de la invención es el de amplificar una secuencia de ácido nucleico por replicación y medir electroquímicamente su presencia en el medio durante el proceso de amplificación, conviene disponer, en primer lugar, de material biológico que permita dicha amplificación. A los efectos de llevar a cabo la técnica de PCR, conviene poner en contacto con el ácido nucleico a amplificar una enzima polimerasa, un par de iniciadores ("primer" en inglés) y los cuatro nucleótidos libres dGTP, dATP, dTTP y dCTP que constituyen el ADN, respectivamente desoxi-guanina-trifosfato, desoxi-adenosina-trifosfato, desoxi-timidina-trifosfato y desoxi-citosina-trifosfato. También pueden emplearse análogos de bases del tipo desoxiribonucleótido-trifosfato, tales como desoxi-deazaguanina-trifosfato.

Así, se introducen en una de las micro-cubetas 12, y según un primer ejemplo de aplicación, además de una muestra biológica a controlar y precisamente un extracto de ADN de citomegalovirus que contiene una secuencia diana de ácidos nucleicos de 283 pares de bases, la ADN polimerasa, esto es la enzima, los iniciadores y los cuatro tipos de nucleótidos, y la totalidad forma una mezcla reactiva que es evidentemente líquida y está tamponada. Además, para medir la intensidad de una señal eléctrica, se agrega a la mezcla reactiva un compuesto oxido-reducible, concretamente el complejo de osmio bis(2,2'-bipiridin)dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina-osmio (II), de número CAS 3555395-37-8, indicado en este caso como $[\text{Os}^{\text{II}}(\text{bpy})_2\text{DPPZ}]^{2+}$ y de fórmula I:



Fórmula I

Se pueden considerar otros compuestos oxido-reducibles, y principalmente con rutenio en lugar de osmio. También se pueden emplear otros ligandos. La ventaja del ligando dipiridofenazina reside en su capacidad para intercalarse entre los nucleótidos que forman las secuencias diana del ácido nucleico. Como otros ligandos a considerar se citan, por ejemplo, DPPX: 7,8-dimetildipirido[3,2-a:2,3-c]fenazina; PTDB: 3-(piridin-2-il)-5,6-difenil-as-triacina; o DPT: 3-(pirazin-2il)-as-triazin[5,6-f]fenantreno; o también ligandos que tienen una función quinona, tal como PHI: fenantreno-quinona-diimina.

Son también susceptibles de emplearse en el método objeto de la invención compuestos orgánicos que intercalen ADN y oxido-reducibles. Se citará por ejemplo, bromuro de etidio, acridina y sus derivados, derivados de acridona o también derivados de fenazina.

Para experimentación y control, se introducen en la otra micro-cubeta 14 los elementos idénticos a los anteriormente citados, salvo la muestra biológica a controlar. Según un ejemplo de realización, las concentraciones de los diferentes elementos introducidos en las micro-cubetas 12, 14 se indican en la Tabla I siguiente.

Tabla I

	Micro-cubeta 12	Micro-cubeta 14
Iniciadores izquierdos	250 nM	
Iniciadores derechos	250 nM	
Nucleótidos libres: dnTP	200 μM	
Tampón PCR	1 x	
Enzima: Hot Star Taq	0,1 U/μl	
[Os(bpy) ₂ -dppz]	0,5 μM	
Extracto de ADN de citomegalovirus de 283 pares de bases	100.000 copias	0 copias

Así, la mezcla reactiva contenida en las dos micro-cubetas 12, 14 es llevada, gracias al módulo de efecto Pelletier 32 controlado por el micro-ordenador 36, a diferentes temperaturas durante periodos determinados. Después del tramo preliminar, donde la mezcla reactiva es llevada una sola vez a una temperatura de 95°C durante 15 minutos, se lleva la mezcla reactiva al primer tramo, a una temperatura de 94°C durante 30 segundos, para deshibridar las secuencias diana de los ácidos nucleicos, es decir para disociar las dos cadenas complementarias de las secuencias diana de los ácidos nucleicos; a continuación, es llevada al segundo tramo a 53°C durante 60 segundos, para que los iniciadores respectivos se hibriden en las cadenas de ADN disociadas; y se lleva al tercer tramo a 72°C durante 60 segundos para permitir a las polimerasas sintetizar una cadena complementaria y formar así el amplicón y la secuencia diana replicada incluida. Finalmente, se lleva la mezcla reactiva a una temperatura de 85°C en un cuarto tramo durante 10 segundos, durante los cuales se requiere el empleo del potencióstato 24 con la intervención del micro-ordenador 36.

Según el primer ejemplo de aplicación definido anteriormente, en el cuarto tramo predefinido y durante el período de 10 segundos, gracias al potencióstato 24, se registra por voltamperometría de ondas cuadradas la curva intensidad/potencial en una zona de potencial que comprende el potencial estándar del compuesto oxido-reducible. Se impone aquí una diferencia de potencial entre el electrodo 20 y el contra-electrodo 22 y se hace variar dicha diferencia

de potencial según un perfil de ondas cuadradas. De forma paralela, se mide la corriente eléctrica que atraviesa dichos electrodos y se obtiene entonces una curva intensidad/potencial en forma de pico cuyo valor de corriente máxima, después de restar una línea base, es representativo de la concentración del compuesto oxido-reducible no intercalado presente en solución.

5 Se hará referencia en primer lugar a las Fig. 3A a 3B y a la Fig. 3C. Más precisamente, se aplican 31 ciclos de replicación a las muestras biológicas contenidas en las micro-cubetas 12, 14. La Fig. 3A ilustra la evolución de las curvas intensidad/potencial en función de los ciclos para las muestras biológicas que incluyen la secuencia diana de nucleótidos buscada, mientras que la Fig. 3B representa la evolución de las curvas intensidad/potencial en función de los ciclos para la mezcla reactiva sin la secuencia diana. En la Fig. 3A, a partir del décimo octavo ciclo 31, el pico 33 de la curva baja significativamente, es decir que el consumo de compuesto oxido-reducible es bajo, para alcanzar la altura media 35 en el decimosegundo ciclo. En el ciclo 31, la curva 37 se vuelve prácticamente plana y su pico alcanza un valor de intensidad inferior al 5% con respecto a las de los primeros ciclos. Así, el compuesto oxido-reducible se ha incorporado en el interior de las moléculas de doble cadena de ADN formadas. Esto implica que la secuencia diana de nucleótidos buscada estaba realmente presente en las muestras biológicas.

15 A la inversa, en la Fig. 3B, el extremo 39 de la curva se mantiene en un valor ligeramente constante hasta el ciclo 31 en comparación con la curva anterior, ya que en estas muestras la secuencia diana de nucleótidos buscada no está presente. No obstante, disminuye ligeramente debido a la formación de dímeros de inicio en la mezcla reactiva.

De este modo, se detecta rápidamente la presencia de una secuencia diana de nucleótidos buscada en una muestra biológica cualquiera mediante el procedimiento descrito anteriormente.

20 Se puede observar que el valor de la corriente pico se normaliza dividiéndola entre el valor medio corregido de la variación de las corrientes pico obtenidas durante los primeros ciclos de amplificación, es decir cuando la cantidad de secuencia diana de nucleótidos replicada no es aún suficiente para hacer caer significativamente la corriente pico medida, por ejemplo en el 5º ciclo.

25 En referencia en la Fig. 3C, ilustra las curvas realizadas de las dos series de curvas anteriormente nombradas, que muestran el valor de la corriente pico así normalizada en función del número de ciclos realizados y para las dos micro-cubetas 12, 14 que comprenden respectivamente la muestra biológica a controlar y el material biológico destinado a la replicación, así como el compuesto oxido-reducible y la otra el material biológico solo con el compuesto oxido-reducible.

30 Así, se observa que hasta el ciclo 25, el valor de la corriente que atraviesa las mezclas reactivas de las dos micro-cubetas 12, 14 es ligeramente paralelo y relativamente constante. Por el contrario, entre el ciclo 25 y más allá del ciclo 30, se observa que el valor de la corriente eléctrica que atraviesa la micro-cubeta 12 incluyendo la muestra biológica a controlar cae drásticamente en comparación con la corriente eléctrica que atraviesa la otra micro-cubeta 14, sin la secuencia diana de ácidos nucleicos determinada. Esta drástica caída y exponencial de la corriente eléctrica, en función de ϵ^c , siendo c el número de ciclos y ϵ la intensidad de amplificación próxima a 2, demuestra la amplificación de la secuencia diana de nucleótidos determinada, cuyos iniciadores eran específicos, y la producción subsiguiente de secuencias diana replicadas. En efecto, la producción de moléculas de secuencias diana de ácido nucleico replicadas provoca entonces la desactivación del compuesto oxido-reducible anteriormente citado vía el intercalado del mismo en la doble cadena formada de la secuencia de ácido nucleico replicada. Así desactivado, el compuesto oxido-reducible no puede intercambiar más carga con la superficie de los electrodos 20, 22 y, por tanto, ya no puede ser detectado electroquímicamente. Esto se refleja en una caída de la señal eléctrica, reveladora de la formación de la secuencia diana de nucleótidos determinada mediante iniciadores específicos en la muestra biológica tratada.

El registro de la corriente se realiza a una temperatura superior a la temperatura denominada de disociación de los dímeros de inicio y/u otras secuencias de ADN no específicamente amplificadas. La selección de la temperatura a la cual se efectúa la medición es un parámetro crítico para discriminar entre una muestra falso positivo y un verdadero positivo.

45 Por otra parte, se hace referencia ahora al gráfico mostrado en la Fig. 4 para describir, según un segundo ejemplo de aplicación, el principio de cuantificación de una secuencia diana de nucleótidos determinada en una muestra dada.

En el eje de las abscisas 51 del gráfico se refleja el número de ciclos de replicación de los medios de amplificación y en el eje de ordenadas 53 los valores normalizados de la corriente máxima registrados en cada ciclo según una forma de realización ilustrada en la Fig. 3A.

50 En el gráfico de la Fig. 4 se representan nueve curvas de calibrado, de derecha a izquierda 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, que representan porciones intermedias ligeramente paralelas entre sí y según una dirección próxima a la vertical. Dichas curvas corresponden respectivamente a los diferentes trazados obtenidos partiendo de una muestra biológica que comprende 10^3 copias de la secuencia diana contenida en el genoma de Citomegalovirus para la primera de las nueve curvas 70 y 10^{11} para la novena 86. De la primera curva 70 a la última 86, el número de copias para cada curva siguiente se multiplica por diez.

De este modo se constata que cuanto mayor cantidad de secuencia diana de nucleótidos contiene la muestra, más pronto disminuye la corriente eléctrica que atraviesa el electrodo en función del número de ciclos. En efecto, cuanto más ácidos nucleicos contiene la muestra de origen incluyendo la secuencia diana determinada, menor es el número de ciclos necesarios para producir por replicación una misma cantidad de secuencias diana de nucleótidos determinada, y, por tanto, antes disminuye la corriente vía el intercalado del compuesto oxido-reducible en las dobles cadenas de las secuencias diana de nucleótidos replicadas. Así, se comprende que es posible medir la cantidad de ácidos nucleicos que incorpora la secuencia diana determinando el número de ciclos a partir del cual la cantidad de corriente que atraviesa la muestra se reduce. Además, la primera curva 70 de la Fig. 4 muestra que la presencia de la secuencia diana sigue siendo detectable cuando sólo 1.000 copias de dicha secuencia se encuentran inicialmente presentes en la muestra.

De esta manera se controló un extracto inicial de concentración de secuencia diana de ácidos nucleicos determinado, mostrándose su curva 88 con trazos discontinuos a lo largo de la segunda curva 72 de calibrado correspondiente a 10^4 copias de la secuencia diana.

De este modo entonces, el método según la invención aplicado a una muestra biológica susceptible de contener una secuencia diana de nucleótidos determinada permite no sólo revelar la presencia o ausencia de dicha secuencia diana de nucleótidos, gracias a la realización de un método de amplificación y de medida electroquímica de un agente oxido-reducible que intercala ADN de doble cadena, sino también permite cuantificar una reproductibilidad y una sensibilidad mejoradas mediante la amplitud de la señal en comparación con otros métodos electroquímicos de la técnica anterior. Este método aprovecha las propiedades oxido-reducibles de un agente intercalando secuencias de ácido nucleico que forman una doble cadena, que no se produce en los métodos de amplificación clásicos, para revelar la presencia de una secuencia diana de ácido nucleico.

Con el objetivo de precisar el método de detección, principalmente en términos de especificidad de identificación de la secuencia diana amplificada, al final de la amplificación se provoca la deshibridación progresiva de todas las secuencias diana replicadas mediante una subida progresiva de la temperatura de la muestra, con el fin de liberar el compuesto oxido-reducible intercalado. Cuando vuelve a ser así electroquímicamente detectable, dicho compuesto oxido-reducibles nuevamente apto para producir una señal eléctrica en los electrodos, representativa de la cantidad de compuesto oxido-reducible liberado y, por tanto, de la naturaleza y de la longitud de la secuencia diana de nucleótidos determinada.

Dicha deshibridación se realiza llevando las moléculas de ADN progresivamente, según una escala de temperatura apropiada, desde una temperatura en la que todas las dobles cadenas están acopladas, esto es aproximadamente 40°C , hasta una temperatura donde todas las dobles cadenas están disociadas, hacia los 98°C , y, para ello, el módulo de efecto Pelletier 32 anteriormente citado constituye un medio excelente. En efecto, éstas último permite proporcionar energía térmica a la mezcla reactiva contenida en las dos micro-cubetas 12, 14, representadas en la Fig. 1, de modo que se provoca la deshibridación de las secuencias diana de nucleótidos replicadas, permitiendo la liberación de dicho compuesto oxido-reducible intercalado. Además, gracias al potencióstato 24 y mediante el micro-ordenador 36, se aplica entonces una diferencia de potencial entre el electrodo 20 y el contra-electrodo 22 y se hace variar dicha diferencia de potencial según el perfil de onda cuadrada anteriormente citado. Se mide la corriente eléctrica que atraviesa dichos electrodos y se determina así una corriente pico.

Por tanto, gracias al módulo de efecto Pelletier 32, se incrementa la temperatura de las mezclas reactivas, por ejemplo grado a grado, entre 70°C y 95°C . Paralelamente, cuando la temperatura de las mezclas reactivas aumenta 1°C , se genera una diferencia de potencial entre los electrodos 20, 22 y se mide la corriente que los atraviesa según el método voltamperométrico anteriormente citado.

Se hará referencia ahora a la Fig. 5A que representa, según un tercer ejemplo de aplicación, un diagrama de la corriente pico obtenida en función de la temperatura y para las dos micro-cubetas 12, 14, una incluyendo la mezcla reactiva con la secuencia diana de nucleótidos buscada y la otra la mezcla reactiva sin dicha secuencia diana.

La curva inferior 40 así obtenida corresponde a la mezcla reactiva que incluye la secuencia diana de nucleótidos y, por tanto, múltiples secuencias diana de nucleótidos replicadas. Así, se observa que el incremento de la temperatura de la mezcla reactiva entre 70°C y 88°C no produce ningún efecto en las moléculas de ADN que incluyen las secuencias diana de nucleótidos. Por el contrario, entre 88°C y 92°C la corriente pico se multiplica por siete. Dicha corriente pico es entonces directamente proporcional a la cantidad de compuesto oxido-reducible liberado y, por tanto, de la naturaleza y de la longitud de la secuencia diana de ácido nucleico determinada, que es, en este caso, de 283 pares de bases.

Se observará en la curva superior 42, correspondiente a la mezcla reactiva sin la secuencia diana de ácido nucleico, que la señal eléctrica medida se duplica entre 70°C y 85°C . Esto es consecuencia del intercalado en los dímeros de inicio y otras dobles cadenas sintetizadas de forma no específica y de tamaño inferior a la secuencia diana de ácido nucleico determinada.

La señalización de la secuencia diana de nucleótidos buscada es aún más concluyente cuando se traspone cada punto de las curvas representadas en la Fig. 5A al valor de la derivada en dicho punto. De este modo se obtienen las curvas de fusión representadas en la Fig. 5B.

Así, la curva inferior 40, correspondiente a la mezcla reactiva que incluye la secuencia diana, se transforma en una curva típica 44 que presenta un pico significativo 46 a la temperatura de 90°C. Evidentemente, dicho pico significativo 46 corresponde a la variación brusca de la corriente de pico observada en la Fig. 5A para la curva inferior 40. Este pico significativo 46 es representativo de la naturaleza y, por tanto, de la longitud de la secuencia diana determinada por la temperatura bajo la cual aparece. En efecto, cuanto más larga es la secuencia diana buscada, mayor es la cantidad de compuesto oxido-reducible incluida en los amplicones, evidentemente para una cantidad equivalente de amplicones. Así, para liberar las moléculas del compuesto oxido-reducible será necesario aportar mayor cantidad de energía térmica para deshibridar la doble cadena formada por la secuencia diana determinada. Por tanto, la temperatura a la cual intervendrá dicha deshibridación será más importante. Además, al ser más importante la cantidad de moléculas de compuesto oxido-reducible incluida en los amplicones, una vez liberada, la señal eléctrica recogida será también más importante.

En consecuencia, cuanto más larga sea la naturaleza de la secuencia diana de nucleótidos, mayor será el pico significativo 46 y desfasado hacia una temperatura elevada.

Por el contrario, en base a la curva superior 42 representada en la Fig. 5A, su transformación en la curva derivada 48 representada en la Fig. 5B hace aparecer un pico ampliado 50 a una temperatura comprendida entre 75°C y 80°C. Dicho pico ampliado 50 corresponde simplemente a la deshibridación de los dímeros de inicio y otras dobles cadenas sintetizadas de forma no específica y de tamaño inferior a la secuencia diana de ácido nucleico y que provocan así la liberación del compuesto oxido-reducible. Se observa que dicho pico ampliado 50 aparece en un intervalo de temperaturas inferior al del pico significativo 46 y que resulta más difuso.

Según un cuarto ejemplo de aplicación, se demuestra que se puede detectar la presencia de al menos dos secuencias diana de nucleótidos distintas en una misma muestra biológica gracias al método de identificación según la invención.

Para ello, se utiliza evidentemente el sistema de identificación representado en la Fig. 1 y se realizan tres series de medidas conforme a los ejemplos de aplicación descritos anteriormente. Se trata de demostrar que se puede identificar en una misma muestra biológica la presencia de una bacteria, *Achromobacter Xylooxidans*, siendo el tamaño de su secuencia diana de 100 pares de bases, y el Citomegalovirus humano, anteriormente utilizado, con un tamaño de secuencia diana de nucleótidos de 283 pares de bases. Una primera serie de medidas corresponde al Citomegalovirus humano y está realizada en las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Una segunda serie de medidas corresponde precisamente a la bacteria *Achromobacter Xylooxidans* y, por tanto, el material de amplificación incluye iniciadores específicos de la secuencia diana correspondiente. Y una tercera serie de medidas corresponde a la mezcla del Citomegalovirus humano y la bacteria *Achromobacter Xylooxidans* y, por tanto, el material de amplificación incluye en este caso los dos iniciadores específicos correspondientes en la mezcla.

Se realiza entonces, conforme al tercer ejemplo de aplicación, las curvas de fusión para las tres series de mediciones.

En la Fig. 6 se representan las tres curvas obtenidas y, para mayor claridad, éstas se desfasan según el eje de ordenadas unas con respecto a otras. De este modo, se observa en dicha Fig. 6 una primera curva 50 referente al Citomegalovirus humano y que corresponde a la curva típica 44 mostrada en la Fig. 5B. Se observa así un primer pico significativo 52 para un valor de temperatura equivalente a 90°C. Por otra parte, al tratarse de la bacteria *Achromobacter Xylooxidans*, la curva de fusión 54 correspondiente a la segunda serie de medidas se caracteriza por un segundo pico significativo 56 para un valor de temperatura próximo a 85°C.

Finalmente, la tercera serie de medidas conduce a una tercera curva 58 que presenta un tercer 60 y un cuarto 62 picos significativos respectivamente para valores de temperatura equivalente a 90°C y a 85°C. Estos valores corresponden exactamente a las de la bacteria sola y del Citomegalovirus humano solo.

Se demuestra así, mediante este cuarto ejemplo de aplicación, gracias al método de identificación según la invención, la posibilidad de detectar una pluralidad de secuencias diana de nucleótidos en una misma muestra biológica.

Según una forma de realización de la invención particularmente ventajosa y no representada aquí, pero conforme a la invención, se prevé poder amplificar una secuencia diana que tiene o no ciertas diferencias en su secuencia e identificar la presencia o no de dichas diferencias mediante una curva de fusión, tal como se define anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Método de identificación electroquímica de secuencias diana de nucleótidos, siendo el método del tipo según el cual:

5 se proporciona una muestra biológica susceptible de contener una secuencia diana de nucleótidos determinada;

se proporcionan medios de amplificación activables que comprenden nucleótidos libres, para provocar la replicación de dicha secuencia diana de nucleótidos determinada y la formación de secuencias diana de nucleótidos replicadas bajo la forma de dobles cadenas de ácidos nucleicos;

10 se proporciona un compuesto oxido-reducible apto para reaccionar frente a dichos nucleótidos y se pone en contacto dicho compuesto oxido-reducible con dicha muestra biológica;

se activan dichos medios de amplificación activables;

se aplica un campo eléctrico a la muestra para activar dicho compuesto oxido-reducible y se mide la corriente eléctrica que atraviesa la muestra representativa de la actividad electroquímica de dicho compuesto oxido-reducible; y

15 se determina la presencia de dicha secuencia diana de nucleótidos determinada si la corriente eléctrica disminuye;

caracterizado porque se proporciona un compuesto oxido-reducible que se intercala durante la replicación entre los nucleótidos que forman dichas secuencias diana replicadas, provocando dichas secuencias diana replicadas la inhibición de la actividad electroquímica de dicho compuesto oxido-reducible intercalado debido a lo cual la corriente eléctrica disminuye.
2. Método de identificación según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos medios de amplificación activables se activan según ciclos de amplificación sucesivos y porque en cada ciclo de amplificación se duplica dicha secuencia diana replicada.
3. Método de identificación según la reivindicación 2, caracterizado porque se registra el número de ciclos de amplificación correspondiente a la disminución de la corriente eléctrica para determinar la concentración de dicha secuencia diana de nucleótidos en la citada muestra.
4. Método de identificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque comprende además las etapas siguientes:

30 proporcionar energía térmica a dicha muestra para provocar la liberación del compuesto oxido-reducible intercalado, y aplicar un campo eléctrico a la muestra para registrar simultáneamente las variaciones de corriente eléctrica que la atraviesan y,

determinar la cantidad de energía térmica Q correspondiente a las variaciones máximas de la corriente eléctrica registradas para identificar la naturaleza de dicha secuencia diana de nucleótidos determinada.
5. Método de identificación según la reivindicación 4, caracterizado porque se proporciona energía térmica a la muestra de modo que se provoca un aumento progresivo de la temperatura de la muestra.
6. Método de identificación según la reivindicación 5, caracterizado porque se provoca un incremento progresivo de la temperatura entre 40°C y 98°C.
7. Método de identificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque se mide la corriente eléctrica representativa de la actividad electroquímica del compuesto oxido-reducible a una temperatura predeterminada de dicha muestra.
8. Método de identificación según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6 y 7, caracterizado porque dicha temperatura predeterminada es ligeramente inferior a la temperatura de la muestra correspondiente a la cantidad de energía térmica Q determinada.
9. Método de identificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque se utiliza una voltamperometría para medir dicha corriente eléctrica.
10. Método de identificación según la reivindicación 9, caracterizado porque se utiliza una voltamperometría de onda cuadrada.
11. Método de identificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque dicho compuesto oxido-reducibles provisto es un compuesto orgánico que intercala ADN.

12. Método de identificación según las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque dicho compuesto oxido-reducibile provisto es un complejo de un metal de transición.
13. Método de identificación según la reivindicación 12, caracterizado porque dicho compuesto oxido-reducibile presenta al menos un ligando intercalado de secuencia de ácido nucleico.
- 5 14. Método de identificación según la reivindicación 12 o 13, caracterizado porque dicho compuesto oxido-reducibile incluye el ligando dipiridofenazina.
15. Método de identificación según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, caracterizado porque dicho compuesto oxido-reducibile incluye al menos un ligando biperidina.
- 10 16. Método de identificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque dicho compuesto oxido-reducibile no oxida las bases nucleotídicas de los nucleótidos libres.
17. Método de identificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque dichos medios de amplificación activables son de tipo PCR.
18. Sistema de identificación electroquímica de secuencias diana de nucleóticos, comprendiendo dicho sistema:
- 15 medios (12, 14) para recibir una muestra biológica susceptible de contener una secuencia diana de nucleótidos determinada;
- medios de amplificación activables que comprenden nucleótidos libres, para provocar la replicación de dicha secuencia diana de nucleótidos determinada y la formación de secuencias diana de nucleótidos replicadas;
- 20 un compuesto oxido-reducibile apto para reaccionar frente a dichos nucleótidos, estando en contacto dicho compuesto oxido-reducibile con la muestra biológica;
- medios de activación (32, 34, 36) para activar dichos medios de amplificación activables;
- medios (20, 22, 24, 26, 28, 36) para aplicar un campo eléctrico a dicha muestra para activar dicho compuesto oxido-reducibile y medios de medida de la corriente eléctrica que atraviesa dicha muestra representativa de la actividad electroquímica de dicho compuesto oxido-reducibile; y
- 25 medios (24, 36) para determinar la presencia de dicha secuencia diana de nucleótidos determinada si la corriente eléctrica disminuye;
- caracterizado porque el compuesto oxido-reducibile se selecciona entre compuestos aptos para intercalarse durante la replicación entre los nucleótidos que forman dichas secuencias replicadas, provocando dichas secuencias diana replicadas la inhibición de la actividad electroquímica del compuesto oxido-reducibile intercalado, disminuyendo por tanto la corriente eléctrica.
- 30 19. Sistema de identificación según la reivindicación 18, caracterizado porque dichos medios de activación (32, 34, 36) están adaptados para activar los citados medios de amplificación activables según ciclos de amplificación sucesivos para duplicar la secuencia diana replicada en cada ciclo de amplificación.
- 35 20. Sistema de identificación según la reivindicación 19, caracterizado porque comprende además medios de registro (36) para registrar el número de ciclos de amplificación correspondiente a la disminución de la corriente eléctrica con el fin de determinar la concentración de dicha secuencia diana de nucleótidos en la muestra.
21. Sistema de identificación según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, caracterizado porque comprende además:
- 40 medios para proporcionar energía térmica (32) a dicha muestra para provocar la liberación del compuesto oxido-reducibile intercalado, y medios (20, 22, 24, 26, 28, 36) para aplicar un campo eléctrico a dicha muestra para registrar simultáneamente las variaciones de corriente eléctrica que la atraviesan y,
- medios para determinar la cantidad de energía térmica correspondiente a las variaciones máximas de corriente eléctrica registradas para identificar la naturaleza de dicha secuencia diana de nucleótidos determinada.
- 45

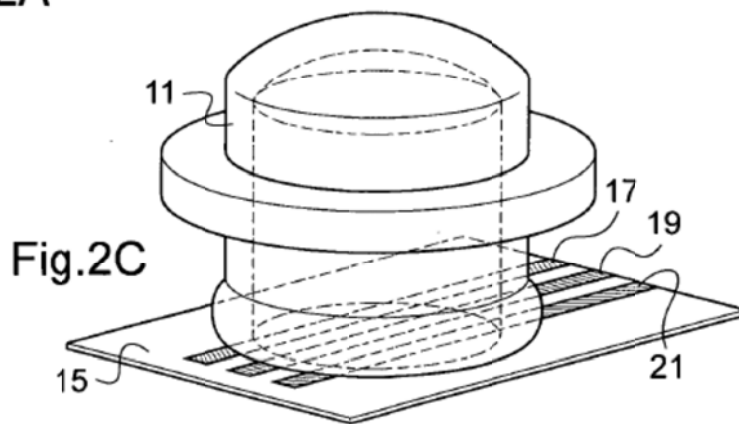
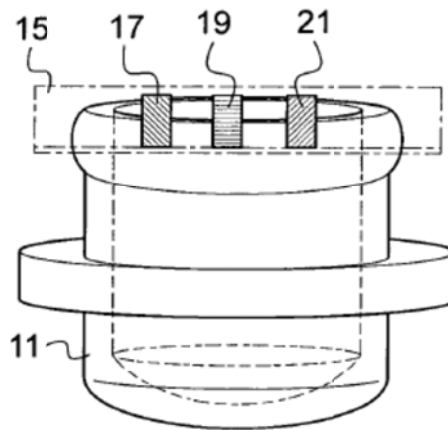
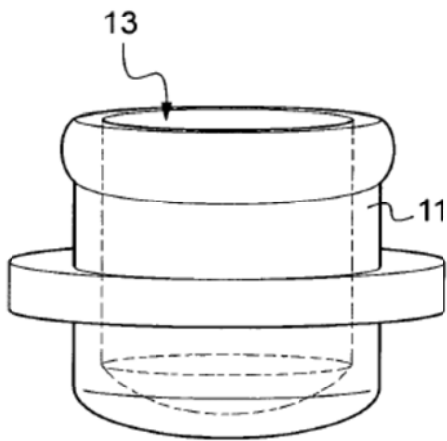
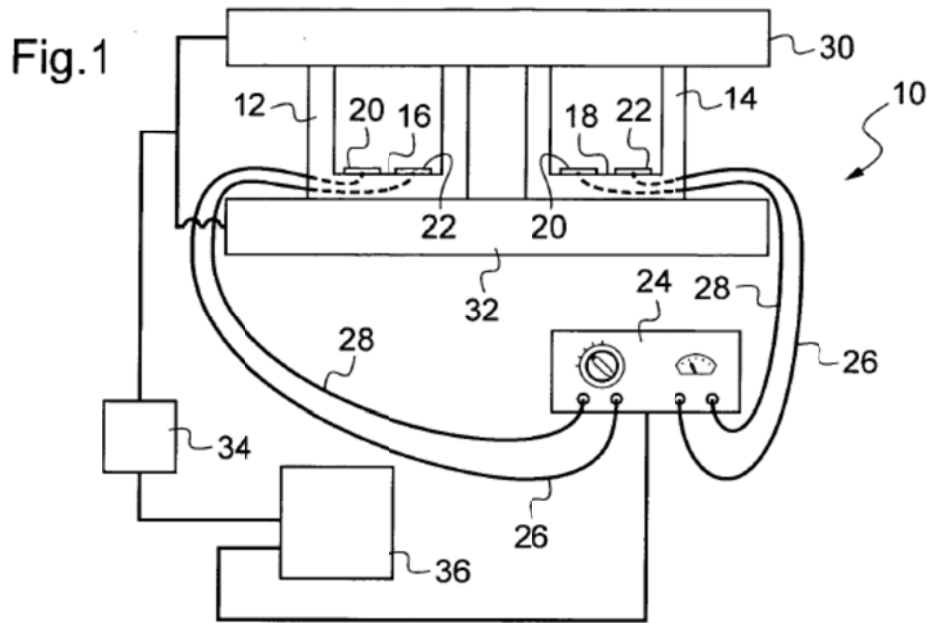


Fig.3A

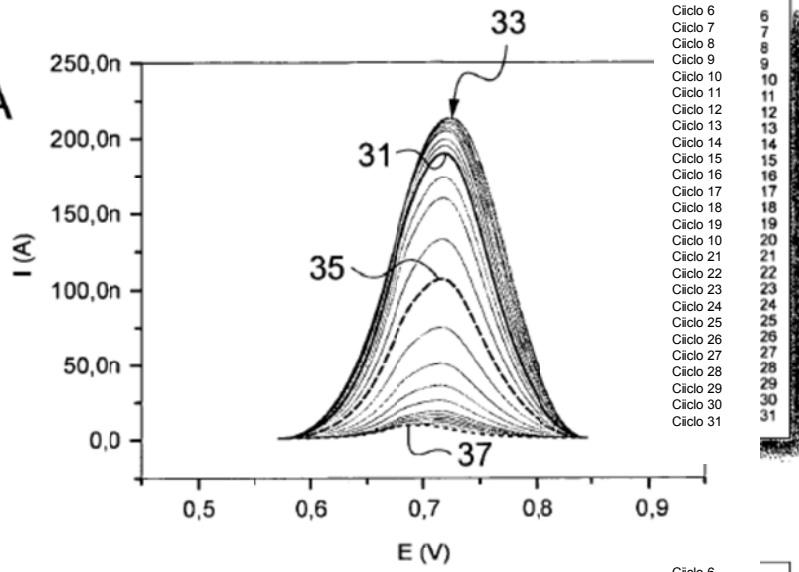


Fig.3B

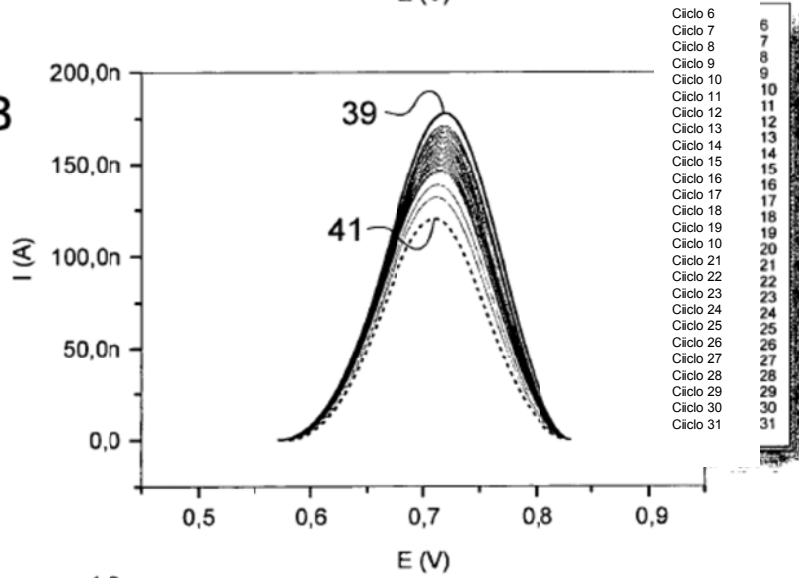
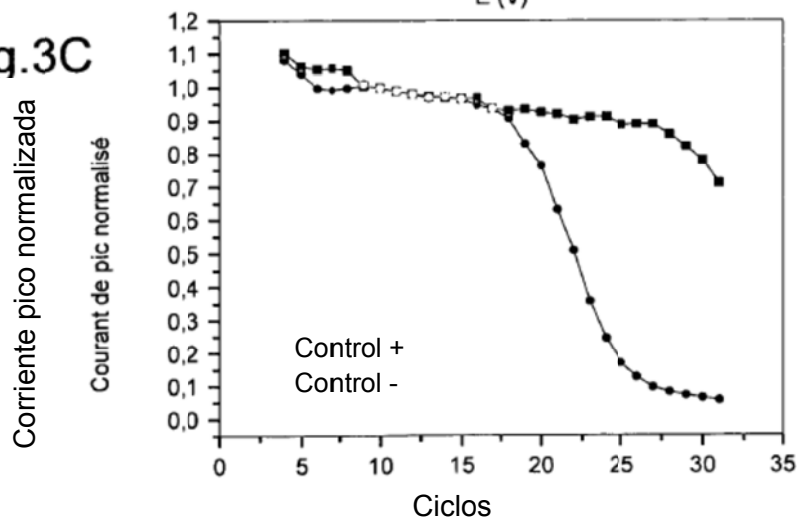


Fig.3C



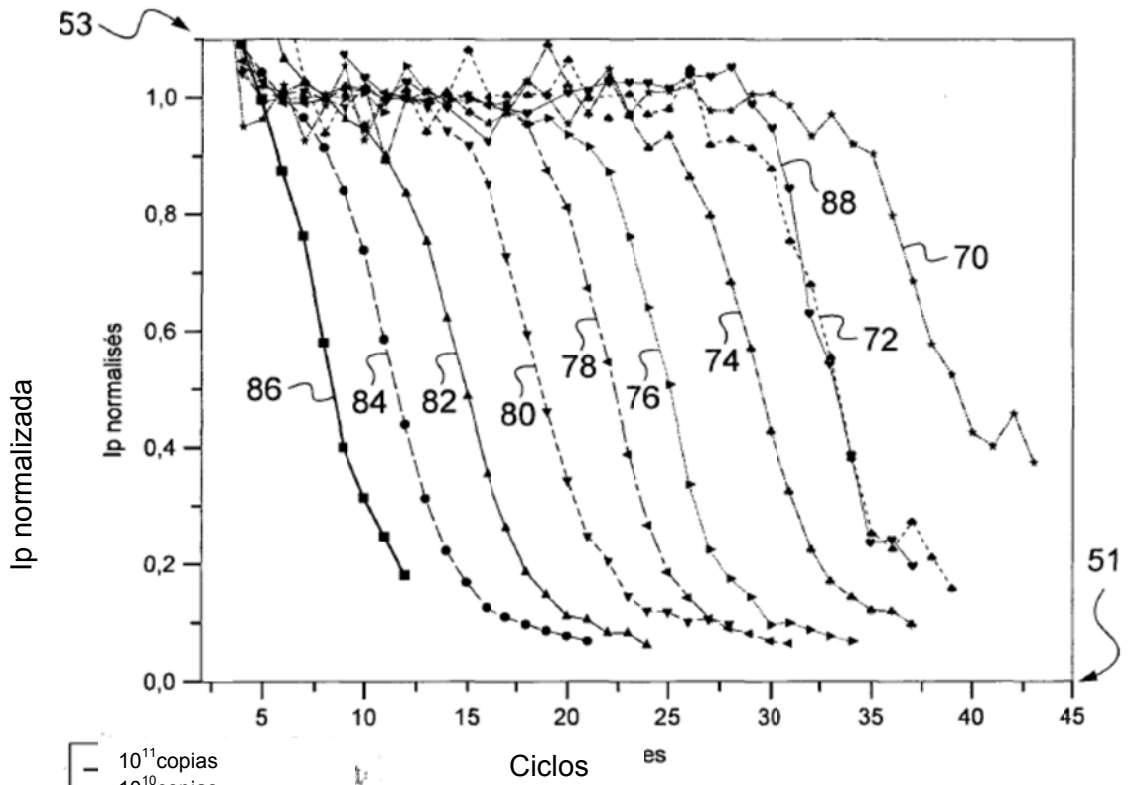


Fig.4

Fig.6

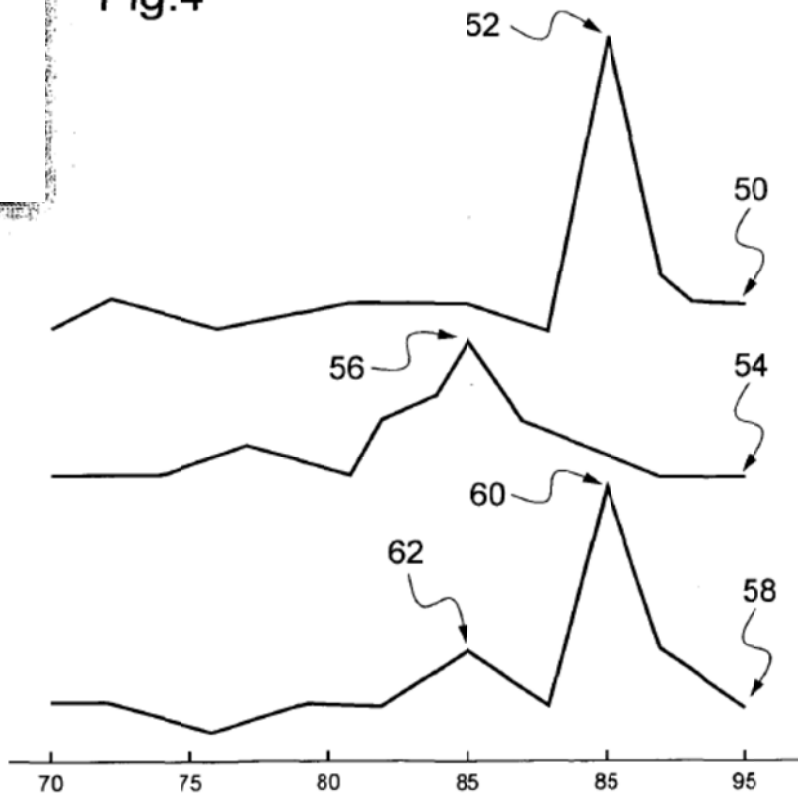


Fig.5A

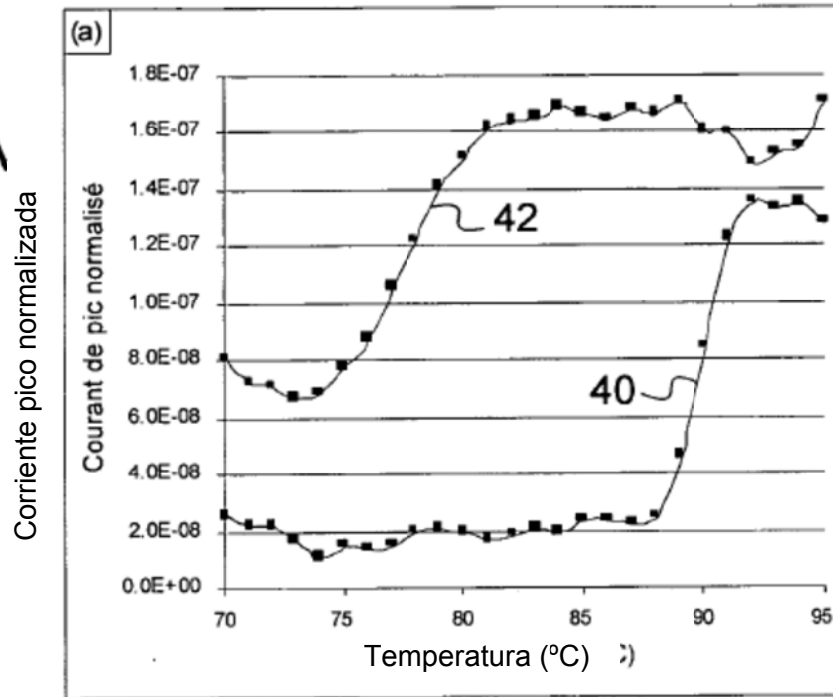


Fig.5B

