

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 571**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/10** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05715667 .1**
- 96 Fecha de presentación: **02.03.2005**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1723233**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.11.2006**

54 Título: **Procedimiento para el enriquecimiento y/o la separación de ADN procariota mediante una proteína que se une específicamente a ADN que contiene motivos CpG no metilados**

30 Prioridad:  
**05.03.2004 DE 102004010928**  
**14.01.2005 DE 102005001889**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.07.2012**

73 Titular/es:  
**SIRS-Lab GmbH**  
**Otto-Schott-Strasse 15**  
**07745 Jena, DE**

72 Inventor/es:  
**SCHMIDT, Karl-Hermann;**  
**STRAUBE, Eberhard;**  
**RUSSWURM, Stefan;**  
**DEIGNER, Hans-Peter;**  
**SACHSE, Svea y**  
**LEHMANN, Marc**

74 Agente/Representante:  
**Roeb Díaz-Álvarez, María**

**ES 2 384 571 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

Procedimiento para el enriquecimiento y/o la separación de ADN procariota mediante una proteína que se une específicamente a ADN que contiene motivos CpG no metilados

La invención se refiere a un procedimiento para la separación y/o el enriquecimiento de ADN procariota y/o para el desenriquecimiento de este ADN a partir de líquidos fisiológicos, usando una proteína conforme a la SEQ ID NO: 2 que se une específicamente a dinucleótidos de citidina-fosfato-guanosina (motivos CpG) no metilados de un ADN, así como al uso de un kit para la realización del procedimiento.

Las infecciones provocadas por bacterias son una de las causas más comunes de las enfermedades inflamatorias. Para el pronóstico del curso de la enfermedad, así como, en especial, para la elección oportuna de las medidas terapéuticas adecuadas, es de crucial importancia la detección temprana de los patógenos bacterianos.

Para la detección de patógenos bacterianos se siguen usando hoy en día principalmente diferentes procedimientos dependientes de cultivo. Sin embargo, estudios actuales ilustran la escasa adecuación de los procedimientos dependientes de cultivo para la detección de agentes patógenos (Hellebrand W., König-Bruhns C., Hass W., Studie zu Blutkulturdiagnostik del año 2002, póster en el Congreso Anual de la Sociedad Alemana de Higiene y Microbiología, Gotinga 2004; Straube E (2003) Sepsis - microbiological diagnosis. Infection 31:284). De acuerdo con ellos, solo se pudieron determinar los agentes patógenos en aproximadamente 15 a 16% de todos los cultivos de sangre analizados. Los inconvenientes de estos procedimientos hicieron que precisamente en la última década, en paralelo al impetuoso desarrollo tecnológico de la biología molecular, se buscaran intensamente otras alternativas. Los primeros informes referentes al uso de procedimientos de detección de patógenos bacterianos independientes de cultivo, que se basan en el principio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), provienen de principios de los años 90. Así, por ejemplo, Miller y sus colegas (Miller N, J Clin Microbiol. 1994 Feb; 32(2):393-7) pudieron mostrar que los procedimientos independientes de cultivo son superiores a las técnicas clásicas de cultivo y de microscopía a la hora de detectar *Mycobacterium tuberculosis*. En los últimos tiempos, sin embargo, han cobrado importancia otros procedimientos de biología molecular basados en la detección de ácidos nucleicos específicos de los agentes patógenos (por ejemplo, M. Grijalva y col., Heart 89 (2003) 263-268; Uyttendaele M y col., Lett Appl Microbiol. 2003;37(5):386-91; Saukkoriipi A y col., Mol Diagn. 2003 Mar;7(1):9-15; Tzanakaki G y col., FEMS Immunol Med Microbiol. 2003 Oct 24;39(1):31-6).

Como ventaja esencial frente a los procedimientos convencionales dependientes de cultivo cabe mencionar, además de la alta especificidad de tales procedimientos de biología molecular, el poco tiempo requerido. Sin embargo, la sensibilidad de la detección de ADN procariota directamente en líquidos corporales y material de análisis no tratado previamente es, hoy por hoy, demasiado baja en comparación con el cultivo de microorganismos. La obtención de una cantidad de ácidos nucleicos de bacterias suficiente para la detección directa del agente patógeno en un material de análisis no tratado previamente también es limitada en el ámbito del análisis del ARNr 16S, mediante PCR de la región 16S en el cromosoma bacteriano y el análisis siguiente de la secuencia del fragmento de PCR, puesto que normalmente se encuentran en el cromosoma varias copias del segmento codificante del ARNr 16S. La detección específica directa del agente patógeno mediante el análisis del ARNr 16S implica que en la muestra que se ha de analizar esté presente solo una especie patógena. Si existen diferentes especies patógenas en la muestra, no es posible realizar una detección específica mediante secuenciación de la región de ARNr 16S, puesto que los cebadores usados son universales para la mayoría de las bacterias. Asimismo es condición previa para la detección del agente patógeno mediante el análisis del ARNr 16S que las bacterias que se han de detectar se encuentren en la fase metabólica y expresen suficiente ARNr 16S. Ésta generalmente no se cumple, especialmente en pacientes que reciben una terapia antibiótica calculada. Además, determinados factores de patogenicidad de las bacterias no se expresan en todo momento aunque estén presentes los genes correspondientes en el genoma bacteriano. Como consecuencia, el médico clínico halla resultados falsos negativos. De este modo, es posible que una terapia antibiótica selectiva no se inicie en absoluto o se inicie demasiado tarde. En estos casos, el médico depende de su conocimiento empírico y de las directrices generales (como, por ejemplo, de la Sociedad Paul Ehrlich) y, por ello, aplicará un tratamiento antibiótico demasiado general. El uso no selectivo de los antibióticos conlleva una serie de riesgos no solo para el paciente individual (como, por ejemplo, efectos adversos innecesarios en forma de daños renales, etc.), sino también para toda la sociedad (por ejemplo, el desarrollo de resistencias adicionales a antibióticos tales como MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, etc.)). Por ese motivo, la detección de los factores de patogenicidad y las resistencias clínicamente relevantes de las bacterias a nivel cromosómico y plasmídico, es decir, finalmente a nivel de ADN, ofrece ventajas considerables para el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas, pero también de la sepsis. Esto es tanto más importante en cuanto a que a este nivel también se puede distinguir entre bacterias patógenas y comensales.

En la mayoría de los casos la detección de ácidos nucleicos específicos del agente patógeno se lleva a cabo mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAT), como, por ejemplo, la multiplicación del ADN procariota mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la reacción en cadena de la ligasa (LCR). La alta especificidad y la rápida disponibilidad de los resultados se oponen a la propensión a fallos por contaminaciones

o factores fuertemente inhibidores de la reacción presentes en las muestras clínicas.

En un procedimiento de detección por PCR convencional debe estar presente teóricamente al menos 1 ADN diana del agente patógeno en 10 µl de sangre para una detección eficaz de agentes patógenos en sangre. Esto equivale a aproximadamente 100 dianas en 1 ml de sangre, o 1.000 dianas en 10 ml de sangre. El caso es distinto cuando se cultiva sangre para la detección de agentes patógenos en una infección. En este caso, el límite de detección inferior se encuentra en aproximadamente 3 a 5 bacterias por 10 ml de sangre.

Este límite de detección actualmente todavía no se alcanza con los procedimientos de PCR, tampoco con aquellos cuya secuencia diana se encuentra en la zona de la región del ARNr 16S en el cromosoma. Aunque en el cromosoma bacteriano se localizan varias regiones que codifican el ARNr 16S (normalmente 3 a 6), sigue sin cumplirse la condición previa de que se encuentre al menos una molécula del ADN molde en la mezcla de reacción de la PCR.

Cabe esperar una mayor seguridad diagnóstica con procedimientos de PCR cuyas secuencias diana específicas codifiquen proteínas específicas de especie, bien en el cromosoma o bien en los plásmidos de los microorganismos. También en este caso se aplica lo dicho anteriormente respecto al límite de detección. Precisamente bajo la influencia de una terapia antibiótica en curso, el crecimiento de los agentes patógenos puede estar fuertemente ralentizado, limitado o bloqueado, aun cuando el antibiótico usado no presente finalmente una eficacia óptima. Esta situación se presenta con frecuencia precisamente en aquellos pacientes que ya se encuentran bajo tratamiento antibiótico y en los que, por esta razón, no se pueden cultivar bacterias patógenas a partir de los cultivos de sangre u otras muestras (como, por ejemplo, frotis traqueales, lavados broncoalveolares (LBA), etc.).

Debido a la insuficiente sensibilidad, la detección de ácidos nucleicos específicos de agentes patógenos sin paso de amplificación mediante la detección directa del ADN procariota (técnica de sondeo, técnica FISH) solo tiene importancia diagnóstica si el número de gérmenes en el material de análisis es suficientemente elevado.

La problemática esencial de la detección de ADN procariota para la identificación de patógenos bacterianos en líquidos corporales reside sobre todo, además de en los componentes inhibidores de la PCR presentes en el material de análisis, en la baja concentración de ADN procariota y el exceso, relacionado con ello, de ADN eucariota frente al procariota. Especialmente los procesos competitivos en el análisis de ADN, así como la pequeña cantidad de ADN procariota, deben considerarse un obstáculo para la detección cualitativa y cuantitativa de agentes patógenos.

Los procedimientos habituales para el aislamiento de ADN enriquecen el ADN total de un líquido corporal, de manera que la relación entre el ADN del huésped y el ADN microbiano puede encontrarse entre  $1:10^{-6}$  y  $1:10^{-8}$ . A partir de esta diferencia es fácil de comprender la dificultad que supone la detección de ADN microbiano en líquidos corporales.

El ADN procariota difiere del ADN eucariota en, por ejemplo, la presencia de motivos CpG no metilados (Hartmann G y col., Deutsches Ärzteblatt, año 98/15:A981-A985 (2001). En el ADN procariota se encuentran motivos CpG en un exceso de 16 veces en comparación con el ADN eucariota, que solo contiene tales motivos transitoriamente, por ejemplo en células cancerosas o regiones promotoras. En el ADN procariota estos motivos no están metilados, mientras que en el ADN eucariota, por el contrario, la mayor parte de ellos están metilados, lo que aumenta de nuevo la diferencia. Los motivos CpG no metilados son dinucleótidos desoxicitilato-desoxiguanilato no metilados dentro del genoma procariota o dentro de fragmentos del mismo.

Asimismo es conocido que a partir de los diferentes patrones de metilación dentro del ADN humano se pueden deducir informaciones diagnósticas para cánceres (Epigenetics in Cancer Prevention: Early Detection and Risk Assessment (Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 983) Editor: Mukesh Verma ISBN 1-57331-431-5). A partir de citosinas metiladas y no metiladas en el genoma se pueden identificar patrones específicos de tejidos, pero también específicos de patologías. Los patrones de metilación específicos para una patología permiten, por una parte, establecer un diagnóstico en un momento muy temprano y, por otra, la clasificación molecular de una patología y la reacción probable de un paciente a un tratamiento determinado. Informaciones detalladas a este respecto se pueden encontrar, por ejemplo, en Beck S, Olek A, Walter J: From genomics to epigenomics: a loftier view of life.", Nature Biotechnology 1999 Dic;17(12):1144, la página web de Epigenomics AG (<http://www.epigenomics.de>) o en el documento WO 200467775.

Cross y col. han mostrado que es posible separar ADN genómico humano con diferentes patrones de metilación por unión de los motivos CpG metilados a una proteína (Cross SH, Charlton JA, Nan X, Bird AP, Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column, Nat. Genet. 1994 Mar;6(3):236-44). Este procedimiento sirve, pues, para la unión de ADN que contiene motivos CpG metilados. Por motivos técnicos no es posible efectuar una separación suficiente de ADN no metilado y metilado, puesto que la proteína usada también se une débilmente a ADN no metilado. Con este procedimiento tampoco es posible enriquecer ADN no metilado, puesto que la capacidad

de la proteína usada no es suficiente, en el caso de un gran exceso de ADN metilado, para separar éste en grado suficiente del ADN no metilado. Además, por la unión del ADN metilado, el volumen inicial en el que se encuentra el ADN no metilado permanece inalterado, de manera que no se logra ningún enriquecimiento.

5 Por lo tanto, sería deseable separar el ADN no metilado del ADN metilado y poder enriquecer el ADN no metilado para separar así ADN procariota del eucariota o ADN humano con diferentes patrones de metilación. Asimismo sería deseable y de gran interés económico-sanitario que la separación y el enriquecimiento del ADN no metilado también se pudiera lograr a partir de una mezcla (por ejemplo, sangre entera) caracterizada por un gran exceso de ADN metilado.

10 Por Voo y col. se sabe que la proteína humana de unión a CpG (hCGBP) es capaz de unirse a motivos CpG no metilados. La publicación describe el factor activador de la transcripción hCGBP, que mostró desempeñar un papel en la regulación de la expresión de genes dentro de motivos CpG.

15 En el documento EP 02020904 se ha presentado un procedimiento que permite la separación y el enriquecimiento de ADN procariota a partir de una mezcla de ADN procariota y eucariota mediante la unión del ADN procariota a una proteína que se une específicamente a ADN no metilado.

20 Por lo tanto, la presente invención se basa en el objetivo de proporcionar un procedimiento que permita la separación y/o el enriquecimiento de ADN procariota a partir de muestras de análisis con una alta proporción de ADN eucariota, en particular de pacientes con infecciones.

Éste se alcanza de acuerdo con la invención mediante el uso de una proteína conforme a la SEQ ID NO: 2 que se une a motivos CpG no metilados.

25 En lo sucesivo se designa con proteína CPGB (o CGBP656) natural la proteína CGB humana (véase Voo y col., Mol Cell Biol. 2000 Mar; 20(6):2108-21). La proteína usada en el procedimiento de acuerdo con la invención se designa en lo sucesivo con CGBP181. La proteína descrita en el documento EP 02020904, que es una variante truncada de la proteína CGB natural y que sirvió de base para la proteína, se denomina en lo sucesivo CGBP241.

30 La invención se describe a continuación haciendo referencia a las figuras, en las que

la figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de CGBP181 (representada en negrita) en comparación con la proteína CPGB natural (CGBP656) y CGBP241 (representada en cursiva);

35 la figura 2 muestra la secuencia de ADN y la traducción a la secuencia de aminoácidos de la proteína de unión a CPG completa CGBP656, estando representados los péptidos de unión a CPG truncados CGBP241 (negrita) y CGBP181 (cursiva);

40 la figura 3 representa una PCR del ADN de estreptococo en sangre humana;

la figura 4 muestra una PCR anidada, con los productos de PCR de la preparación de PCR primaria de la figura 3 como molde;

45 la figura 5 representa un experimento de retardo en gel;

la figura 6 refleja otro experimento de retardo en gel;

50 la figura 7 muestra la elución de ADN de timo de ternera y pUC18emm en Sepharose-hCGBP181 y

la figura 8 representa la determinación del ADN eluido en las fracciones midiendo la extinción a 254 nm en función del gradiente de NaCl;

55 la figura 9 representa los resultados de la PCR después del enriquecimiento de ADN procariota a partir de una mezcla de ADN de *Staphylococcus aureus* y ADN humano usando la proteína CGBP181 acoplada a CNBr-Sepharose y

60 la figura 10 representa los resultados de la PCR después del enriquecimiento de ADN procariota a partir de una mezcla de ADN de *Staphylococcus aureus* y ADN humano usando la proteína CGBP181 acoplada a AH-Sepharose.

La proteína CGB natural CGBP656 se une a los motivos CpG no metilados del ADN procariota, formándose un complejo proteína/ADN. Éste, por ejemplo, puede unirse o estar unido a un soporte, de modo que se puede efectuar una separación y/o un enriquecimiento del ADN. La presente invención se basa, pues, en el reconocimiento sorprendente de que una proteína conforme a la SEQ ID NO: 2, truncada en comparación con la proteína CGB

natural (CGBP656 con 656 aminoácidos) posee mejores propiedades de unión a motivos CpG no metilados de ADN procariota que la proteína CGBP natural y variantes de la misma con una homología del 80% o mayor. Un ejemplo de una proteína truncada de este tipo es la CGBP181 con 181 aminoácidos.

- 5 El ADN procariota difiere del ADN eucariota en, por ejemplo, la presencia de motivos CpG no metilados (Deutsches  
 5 Ärzteblatt, año 98/15: A981-A985 (2001)). La invención se basa en el conocimiento de que el ADN eucariota y el  
 ADN procariota difieren en su proporción de motivos CpG. En el ADN procariota se encuentran los motivos CpG en  
 un exceso de 20 veces en comparación con el ADN eucariota, que contiene tales motivos solo transitoriamente, por  
 ejemplo en células cancerosas o en regiones promotoras (Deutsches Ärzteblatt, año 98/15: A981-A985 (2001)). En  
 10 el ADN procariota estos motivos no están metilados, mientras que en el ADN eucariota, por el contrario, la mayor  
 parte de ellos están metilados, lo que aumenta de nuevo la diferencia. Los motivos CpG no metilados son  
 dinucleótidos desoxicitidilato-desoxiguanilato no metilados dentro del genoma procariota o dentro de fragmentos del  
 mismo.
- 15 La invención se basa asimismo en el conocimiento de que la proteína conforme a la SEQ ID NO: 2 se une  
 específicamente a los motivos CpG no metilados. Esta propiedad de unión específica de la proteína se aprovecha  
 para unir ADN procariota y a continuación enriquecerlo, separarlo y aislarlo de esta manera a partir de una muestra  
 con, por ejemplo, una proporción predominante de ADN eucariota.
- 20 La expresión "ADN que contiene motivos CpG no metilados" se refiere a ADN tanto eucariota como procariota. Éste  
 se puede haber purificado y vuelto a disolver (por ejemplo, ADN no metilado aislado de tejidos), o puede estar  
 presente directamente en la fuente original (por ejemplo, líquido corporal, tal como sangre, suero, aspirado traqueal,  
 orina, lavado broncoalveolar, frotis nasal, frotis cutáneo, líquido de punción).
- 25 Según una forma de realización preferida, el ADN que contiene motivos CpG no metilados es ADN procariota, en  
 especial ADN bacteriano.

El término "truncado" como se usa para la caracterización de la proteína conforme a la SEQ ID NO: 2 significa que la  
 longitud de la secuencia de aminoácidos de la proteína CGBP181 es menor que la longitud de la secuencia de  
 30 aminoácidos de la proteína CGB natural. El truncamiento se efectúa en los extremos N-terminal y C-terminal de la  
 secuencia proteica natural (figura 1). El truncamiento máximo lo constituye el sitio de unión a ADN de la proteína.

- La proteína usada puede presentar, por ejemplo, un peso molecular de aproximadamente 19.959 Dalton (nativa) o  
 21.444 Dalton (en el plásmido pQE60). El punto isoelectrico de la proteína puede ascender a aproximadamente  
 35 10,09 (proteína nativa) o 10,15 (en el plásmido pQE60). La proteína usada en el procedimiento de acuerdo con la  
 invención posee la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2 o la fig. 1. Presenta unas propiedades  
 de unión especialmente buenas para los motivos CpG no metilados del ADN procariota.

- La proteína descrita en el documento EP 02020904 (CGBP241), que es una variante truncada de la proteína CPGB  
 40 natural (CGBP656) y que sirvió de base para la proteína CGBP181, presenta una longitud de 241 aminoácidos, un  
 peso molecular de aproximadamente 33.650 Dalton (nativa) o 28.138 Dalton (en el plásmido pQE60) y un punto  
 isoelectrico de 9,89 (nativa) o 9,88 (en el plásmido pQE60). En las figs. 1 y 2 se muestran las secuencias de ADNc  
 y de aminoácidos.

- 45 La proteína CGB natural presenta una longitud de 656 aminoácidos, 135 restos de carga positiva y 94 de carga  
 negativa, un peso molecular de aproximadamente 75.684 Dalton y un punto isoelectrico de 8,15. En la fig. 1 se  
 muestran las secuencias de ADNc y de aminoácidos.

- 50 En las figs. 1 y 2 se representa la comparación de la secuencia de la proteína CGBP181 conforme a la SEQ ID NO:  
 2 con la de la proteína descrita en el documento EP 02020904 (CGBP241).

- La proteína conforme a la SEQ ID NO: 2 se produce preferentemente por clonación de la secuencia de ADNc  
 correspondiente en un plásmido y expresión en *Escherichia coli*. El 16 de febrero de 2004 se depositó una cepa de  
 55 *E. coli* que expresa la proteína en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares bajo el número  
 DSM 16229. Como alternativa se pueden usar para la producción otros procedimientos conocidos para el experto. El  
 uso del plásmido pQE9 constituye una opción posible, pero se puede usar cualquier otro plásmido adecuado como  
 vector. La expresión en *E. coli* también es solo un ejemplo. Otras formas de realización posibles para la obtención de  
 proteínas son la expresión en otros sistemas procariotas o en un sistema eucariota, así como la síntesis química o  
 60 enzimática o la purificación a partir de una fuente natural, como, por ejemplo, plantas de tabaco. La proteína se  
 puede producir tanto a escala de laboratorio (por ejemplo, en un matraz Erlenmeyer) como a escala industrial (por  
 ejemplo, en un fermentador). La proteína de acuerdo con la invención se puede purificar, por ejemplo, mediante la  
 unión de restos histidina (His-tag) incorporados al principio o al final de la proteína a una matriz adecuada con  
 contenido en níquel, procedimiento que es conocido para el experto.

Otras opciones de purificación pueden consistir en cualquier tipo de proteínas de fusión que permitan la purificación mediante matrices adecuadas (columnas, geles, perlas, etc.). Otras formas de tag pueden ser péptidos/ proteínas de fusión, por ejemplo estreptavidina-tag, Myc-tag y otros.

5 Una forma preferida de la proteína conforme a la SEQ ID NO: 2 es la forma nativa, pero también es adecuada una forma desnaturalizada para la unión a motivos CpG no metilados. Por "formas desnaturalizadas" en el sentido de la presente invención se entienden estructuras secundarias distintas de las que se presentan en la naturaleza.

10 La forma nativa o también desnaturalizada de la proteína constituye un ejemplo de una forma de realización. La invención incluye la síntesis *in vitro*, así como todas las modificaciones químicas o enzimáticas adicionales de la proteína, como, por ejemplo, la incorporación de puentes disulfuro, glucosilaciones, fosforilaciones, acilaciones, sustituciones de aminoácidos, así como la fusión con proteínas u otras moléculas. Tales modificaciones se pueden obtener, por ejemplo, por recombinación y/o expresión y/o modificación química y/o enzimática de algunos o varios aminoácidos.

15 La proteína conforme a la SEQ ID NO: 2 presenta numerosas ventajas. Puede unirse a ADN procariota a través de los motivos CpG no metilados mejor que la proteína CGB natural o sus variantes con una homología del 80% o mayor. De este modo es posible separar y/o enriquecer específicamente el ADN procariota a partir de una mezcla de ADN procariota y eucariota. Esto permite finalmente realizar una detección rápida y sencilla de los agentes patógenos, así como establecer un diagnóstico temprano de infecciones que puedan ser causadas por patógenos bacterianos. A la inversa, la invención también se puede aplicar para el desenriquecimiento de ADN microbiano, en el sentido de una purificación, en estados clínicos que estén relacionados con una presencia no fisiológica de bacterias o de sus productos de disociación en los líquidos corporales, en especial en la sangre, de los pacientes. Esto es especialmente válido dado que está bien documentado que las bacterias, pero también sus productos de disociación como, por ejemplo, el ADN bacteriano, son responsables de numerosos efectos biológicos que dañan al paciente.

20 Debido a la buena capacidad de unión de la proteína conforme a la SEQ ID NO: 2 a los motivos CpG no metilados del ADN procariota, es objeto de la invención un procedimiento para la separación y/o el enriquecimiento de ADN procariota con los pasos de

35 a) poner al menos un ADN procariota en solución en contacto con una proteína que se una específicamente al ADN procariota y que presente una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID NO: 2 de modo que se forme un complejo proteína/ ADN, siendo la proteína capaz de reconocer motivos CpG no metilados, y  
b) separar el complejo.

Asimismo se prefiere que después del paso b) se amplifique el ADN procariota en un paso c). Un procedimiento de este tipo comprende preferentemente los pasos:

40 a) aislamiento del ADN procariota a partir del complejo proteína/ ADN,  
b) desnaturalización del ADN de cadena doble,  
c) hibridación de las cadenas sencillas del ADN con cebadores complementarios,  
d) generación de fragmentos de cadena doble mediante una reacción con polimerasas y  
e) repetición de estos pasos hasta obtener el grado de amplificación deseado.

45 Se prefiere que el procedimiento comprenda asimismo:

50 a) clonación de las secuencias de ADN procariotas aisladas en vectores,  
b) transformación de células huésped adecuadas con estos vectores,  
c) cultivo de estas células transformadas,  
d) aislamiento de los vectores a partir de estas células y  
e) aislamiento del ADN.

55 El ADN se puede haber purificado y vuelto a disolver, o puede estar presente directamente en la fuente original (por ejemplo, líquido corporal, tal como sangre, suero, aspirado traqueal, orina, lavado broncoalveolar, frotis nasal, frotis cutáneo, líquido de punción).

60 La separación se puede llevar a cabo mediante diferentes procedimientos de separación, aislamiento o enriquecimiento de complejos ADN/ proteína o complejos ADN/ polipéptido suficientemente conocidos para el experto. Preferentemente se usan procedimientos en los que la proteína de unión a ADN está inmovilizada o se inmoviliza en un soporte para separar y/o enriquecer el ADN a partir de la solución de muestra.

Según una forma de realización preferida, le sigue a la separación un paso para separar el ADN de la proteína a partir del complejo. Esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante procedimientos de purificación de ADN

convencionales conocidos para el experto. En el caso más sencillo, la separación se basa en el cambio del valor de pH o de la concentración de sal (por ejemplo a NaCl 1 M) en el medio/ tampón o en la adición de reactivos caotrópicos, etc.; es decir, parámetros adecuados que conducen a la disolución del complejo proteína/ ADN. Tales procedimientos son conocidos para el experto.

5 Según otra forma de realización preferida, la proteína está unida a un soporte. Esta forma de realización constituye una opción especialmente sencilla para el enriquecimiento de ADN procariota, puesto que la separación a partir de la solución se puede realizar de manera especialmente sencilla mediante, por ejemplo, la retirada física (por ejemplo, centrifugación) del o de los soportes cargados de la solución.

10 Para la solución del ADN procariota se considera en principio cualquier disolvente adecuado. Sin embargo, el procedimiento resulta especialmente conveniente para el enriquecimiento de ADN procariota a partir de soluciones que contienen diferentes especies biomoleculares, en particular diferentes tipos de ADN. La invención se refiere preferentemente a un procedimiento para la separación y el enriquecimiento de ADN procariota o vírico a partir de una mezcla de ADN procariota y eucariota. Por ejemplo, el ADN procariota presente en líquidos corporales se separa del ADN eucariota y se enriquece mediante la unión específica a la proteína conforme a la SEQ ID NO: 2. El ADN procariota así enriquecido facilita la detección de agentes patógenos procariotas con la ayuda de procedimientos de biología molecular y puede contribuir al diagnóstico de enfermedades causadas por agentes patógenos.

20 La forma de realización en la que la proteína de unión a ADN conforme a la SEQ ID NO: 2 está inmovilizada en la superficie de un soporte es especialmente adecuada para una adsorción de ADN procariota a partir de líquidos corporales, preferentemente de la sangre. Este planteamiento brinda, además, la posibilidad de eliminar de ellos ADN microbiano presente en la sangre o en otros líquidos corporales. El líquido corporal (por ejemplo, sangre entera, suero o fluido) así purificado del ADN microbiano, el cual también es capaz de provocar por sí solo graves reacciones inflamatorias en los pacientes, se puede volver a introducir después en el cuerpo. Este principio se puede usar, pues, para el desenriquecimiento de ADN procariota en líquidos fisiológicos en el sentido de una purificación, en el que se aprovechan las propiedades de unión especiales de la proteína conforme a la SEQ ID NO: 2.

30 Para incrementar la capacidad y eficacia de unión a los motivos CpG no metilados de un ADN la invención facilita un procedimiento que aumenta la capacidad y eficacia de unión de la proteína y permite de este modo mejorar la separación y/o el enriquecimiento de ADN no metilado a partir de una mezcla de ADN metilado y ADN no metilado.

35 Esto se logra de acuerdo con la invención mediante el acoplamiento indirecto de la proteína a la matriz. Este procedimiento se describe a continuación haciendo referencia a las figuras 9 y 10.

40 Para incrementar la capacidad y eficacia de unión de la proteína CGBP181 a ADN que contiene motivos CpG no metilados, la unión indirecta de la proteína a la matriz se realiza a través de un espaciador. Mediante el acoplamiento de la proteína a la matriz a través de un espaciador se aumenta el grado de movilidad, así como el número de sitios de unión libres de la proteína CGBP181. De este modo se logra un incremento de la capacidad y eficacia de unión. Además, se puede reducir la cantidad de proteína usada.

45 Por espaciador se entienden en el sentido de esta invención moléculas cortas en forma de cadena que permitan crear una distancia espacial entre la matriz y la proteína usada de acuerdo con la invención, por ejemplo la proteína CGBP181. Tales espaciadores son conocidos para el experto, por ejemplo por la cromatografía de afinidad o la inmovilización de proteínas. Tales moléculas en forma de cadena se componen de átomos de C y de H, así como, dado el caso, de heteroátomos, por ejemplo N. Estas moléculas en forma de cadena se componen de miembros de cadena individuales basados en los átomos de C, por ejemplo CH<sub>2</sub>, y en heteroátomos presentes dado el caso, por ejemplo NH. El espaciador presenta, en particular, entre 4 y 20, preferentemente entre 7 y 10, miembros de cadena. Un espaciador especialmente preferido deriva de diaminohexano (NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>). Los anticuerpos no se consideran espaciadores en el sentido de la presente invención.

50 Con matriz en el sentido de esta invención se designan las sustancias que sirven de soporte para el espaciador y la proteína. Los materiales de soporte pueden ser, por ejemplo, Sepharose, celulosa en perlas, sílice o sustancias similares conocidas para el experto.

55 Por líquidos corporales se entienden en el sentido de la invención todos los líquidos procedentes del cuerpo de un mamífero, incluido el ser humano, en especial aquellos que puedan presentar agentes patógenos, como, por ejemplo, sangre, orina, fluido, líquido pleural, pericárdico, peritoneal y sinovial. La descripción de la invención en relación con la sangre humana no constituye ninguna limitación, sino únicamente un ejemplo de aplicación.

60 Por patógenos bactrianos se entienden preferentemente los agentes patógenos causantes de una sepsis, pero también todos los demás patógenos bacterianos causantes de infecciones. Pueden diferir de los agentes comensales que pertenecen a la colonización normal del organismo y que ocasionalmente también se encuentran

en muestras de análisis de pacientes pero que no tienen importancia clínica.

En el aislamiento del ADN total a partir de líquidos corporales infectados, la relación entre el ADN del huésped y el ADN del agente patógeno a menudo puede ser tan solo de  $1:10^{-6}$  a  $1:10^{-8}$  o incluso menor. Mediante la unión específica del ADN procariota a la proteína conforme a la SEQ ID NO: 2 se puede obtener con el procedimiento de acuerdo con la invención un enriquecimiento de 1 unidad de potencia y más.

La proteína conforme a la SEQ ID NO: 2 puede estar acoplada al soporte de forma directa o indirecta. El tipo de acoplamiento depende del soporte y del material de soporte. Como soporte se consideran, en particular, membranas, micropartículas y resinas o materiales similares para matrices de afinidad. Los materiales adecuados para la unión de la proteína conforme a la SEQ ID NO: 2, así como la realización de la unión en función del tipo de material, son suficientemente conocidos para el experto. Para el acoplamiento indirecto son adecuados, por ejemplo, anticuerpos específicos contra la proteína conforme a la SEQ ID NO: 2 o el polipéptido que a su vez se han unido al soporte mediante procedimientos conocidos.

Una aplicación del procedimiento de acuerdo con la invención consiste en el enriquecimiento de ADN procariota. Otra aplicación reside en la separación de ADN procariota a partir de una mezcla de ADN eucariota y procariota por medio de la unión del ADN procariota a la proteína conforme a la SEQ ID NO: 2, la cual se ha inmovilizado, por ejemplo, en una matriz. La mezcla de ADN endógeno y procariota se pone en contacto con la matriz de afinidad mediante procedimientos adecuados y el ADN procariota se une a la proteína inmovilizada; el ADN eucariota atraviesa, por ejemplo, una columna de separación y se puede recoger por separado. Las matrices de afinidad pueden ser, por ejemplo, polisacáridos poliméricos, tales como agarosas, otros biopolímeros, polímeros sintéticos, o soportes con una estructura básica de silicato, tales como vidrios porosos u otros soportes sólidos o flexibles, en los que se inmoviliza la proteína de unión a ADN conforme a la SEQ ID NO: 2. Una vez separado el ADN procariota del eucariota, la matriz de afinidad se lava con un reactivo adecuado, de manera que se separe la proteína de unión junto con el ADN procariota acoplado de la matriz y/o el ADN procariota de la proteína de unión y esté disponible en una cantidad suficiente para pasos de trabajo posteriores.

Otra aplicación del procedimiento de acuerdo con la invención consiste en la separación y el enriquecimiento de ADN procariota respecto a ADN eucariota mediante la unión del ADN procariota a la proteína conforme a la SEQ ID NO: 2 que se ha inmovilizado en micropartículas. Se consideran en este caso todas las micropartículas que permitan una inmovilización de la proteína de unión a ADN. Tales micropartículas se pueden componer de látex, plástico (por ejemplo, poliestireno expandido, polímero), metal o sustancias ferromagnéticas. Asimismo se pueden usar micropartículas fluorescentes, como las que ofrece, por ejemplo, la empresa Luminex. Una vez unido el ADN procariota a las proteínas inmovilizadas en las micropartículas, las micropartículas se separan de la mezcla de sustancias con procedimientos adecuados, como, por ejemplo, filtración, centrifugación, precipitación, clasificación por medición de la intensidad de la fluorescencia o procedimientos magnéticos. Una vez separado de las micropartículas, el ADN procariota se encuentra disponible para el procesamiento posterior.

Otra aplicación del procedimiento de acuerdo con la invención reside en la separación y el enriquecimiento de ADN procariota respecto a ADN eucariota mediante la unión del ADN procariota a la proteína conforme a la SEQ ID NO: 2 que a continuación se separa del resto de los componentes de la mezcla mediante electroforesis.

Otra aplicación del procedimiento de acuerdo con la invención consiste en la separación y el enriquecimiento de ADN procariota respecto a ADN eucariota mediante la unión del ADN procariota a la proteína conforme a la SEQ ID NO: 2, uniéndose la proteína a continuación a anticuerpos correspondientes. Los anticuerpos pueden estar unidos a sustratos sólidos o flexibles, por ejemplo vidrio, plásticos, silicio, micropartículas, membranas, o se pueden encontrar en solución. Después de la unión del ADN procariota a la proteína y su unión al anticuerpo específico se lleva a cabo la separación a partir de la mezcla de sustancias con procedimientos conocidos para el experto.

El procedimiento de acuerdo con la invención también se puede usar para purificar líquidos corporales de ADN procariota. En este caso resulta conveniente que la separación se realice de forma extracorpórea en condiciones estériles para que los líquidos corporales se puedan volver a introducir en el cuerpo, de manera que el sistema inmune endógeno es apoyado en la eliminación de infecciones al eliminar el ADN procariota presente en los líquidos corporales.

Para la eliminación extracorpórea del ADN procariota de los líquidos corporales se consideran todos los procedimientos químicos, mecánicos o electroquímicos adecuados. Otra aplicación conveniente también la constituye la combinación con otros procedimientos extracorpóreos, tales como la hemoperfusión, la máquina cardiopulmonar o el adsorbente de endotoxinas.

La proteína conforme a la SEQ ID NO: 2 también se puede usar para la detección de ADN procariota. En este caso le sigue al enriquecimiento del ADN procariota un paso para la amplificación del ADN procariota, para el cual son adecuados todos los procedimientos de amplificación usuales (PCR, LCR, LM-PCR, etc.).

El procedimiento de acuerdo con la invención, especialmente con las formas de realización antes descritas, presenta la ventaja de que mediante la unión específica del ADN procariota rico en motivos CpG no metilados a proteínas con una afinidad específica por tales estructuras, se logra concentrar ADN procariota a partir del ADN total de un huésped infectado y, con ello, se aumenta considerablemente la sensibilidad de detección de los procedimientos de detección de ADN patógeno en líquidos corporales.

Las opciones para separar el ADN procariota del ADN eucariota con una proteína de unión específica no consumen más tiempo que los procedimientos conocidos para el aislamiento de ADN total. La detección posterior del ADN puede efectuarse mediante una reacción de PCR. En la mayoría de los casos no será necesario realizar una PCR anidada, de manera que es posible ahorrar un tiempo considerable en el diagnóstico.

Anteriormente ya se ha comentado el uso de la proteína conforme a la SEQ ID NO: 2 para el desenriquecimiento de ADN procariota en líquidos corporales fisiológicos. Un desenriquecimiento en el sentido de la presente invención significa que se reduce la cantidad de ADN procariota. Esta posibilidad de reducir el ADN procariota también permite usar las proteínas en la técnica medioambiental, la gestión de aguas residuales y la técnica climática.

La invención se refiere además a un procedimiento para la separación y el enriquecimiento de ADN genómico no metilado a partir de una mezcla de ADN genómico no metilado y ADN genómico metilado. El ADN genómico metilado se separa mediante la unión del ADN genómico no metilado a la proteína CGBP181 acoplada a una matriz. Este modo de procedimiento contribuye de forma considerable a la simplificación del análisis de los patrones de metilación del ADN genómico metilado y permite establecer el diagnóstico de enfermedades que presentan un patrón de metilación específico, en especial de cánceres.

El procedimiento para la separación y/o el enriquecimiento de ADN genómico no metilado a partir de una mezcla de ADN genómico no metilado y ADN genómico metilado comprende los pasos de:

- a) poner un ADN genómico no metilado en solución en contacto con una proteína que se una específicamente a ADN no metilado y que presente una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID NO: 2 de modo que se forme un complejo proteína/ ADN y
- b) separar el complejo.

La invención se refiere asimismo al uso de un kit para el enriquecimiento de ADN procariota mediante uno de los procedimientos antes descritos, en el que están contenidos al menos la proteína conforme a la SEQ ID NO: 2 junto con, dado el caso, reactivos adecuados adicionales para la realización del procedimiento.

Además de la proteína conforme a la SEQ ID NO: 2, el kit puede contener al menos un conjunto de cebadores que sean adecuados para la amplificación del ADN genómico de determinados organismos procariotas en condiciones convencionales.

La invención se explica a continuación con más detalle mediante los ejemplos pero sin limitarla a ellos.

#### **Ejemplo 1: Producción de la proteína conforme a la SEQ ID NO: 2:**

A partir de la secuencia de ADN para la proteína CGB completa se construyeron los cebadores 1 (GGATCCGGTGGAGGGCGCAAGAGGCCTG directo SEQ ID nº 3) y 2 (AAGCTTAGAGGTAGGTCCTCATCTGAG inverso SEQ ID nº 4) que amplifican un fragmento de ADN truncado que codifica una proteína de unión a CPG truncada, CGBP181. El fragmento de ADN se ligó en el vector pQE9 (Qiagen) tras la escisión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind* III. En el pQE9 se genera un marco de lectura abierto en el que se fusiona al extremo 5' un fragmento de ADN que codifica 6 x His-Tag (pQE9[6HisCGBP181]). Más adelante se muestra la secuencia de aminoácidos completa de la proteína de fusión codificada 6HisCGBP181, en la que el segmento impreso en negrita representa el péptido CGBP181 y los segmentos impresos en cursiva indican los aminoácidos extraños fusionados del plásmido pQE9.

Se transformó la cepa de expresión de *E. coli* M15[pREP4] (Qiagen) con el plásmido pQE[6HisCGBP181]. El clon se denomina en lo sucesivo M15[pCGBP181] y la proteína expresada, rCGBP181. La expresión de la proteína rCGBP181 se llevó a cabo según el protocolo siguiente: Se cultiva bajo agitación a 37°C durante la noche una colonia de la cepa de expresión M15[pCGBP181] en 2 ml de medio de Luria con 100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina. A continuación, el cultivo previo se transfiere a 200 ml de un medio de cultivo precalentado que contiene las mismas concentraciones de antibióticos. Después de crecer durante 3 horas a 37°C bajo agitación se añade IPTG para la inducción de la expresión y se incuba durante otras 5 horas. Después se recogen las bacterias por centrifugación y el sedimento se resuspende en 5 ml de tampón Tris 0,2 M, pH 7,5. Las bacterias se tratan 5 x 1 min con ultrasonido en un baño de hielo. Después de la centrifugación, el sedimento se resuspende en 10 ml de Tris 0,2 M, urea 2 M, pH 7,5, y se agita durante 15 min. Una vez realizada la centrifugación, el sedimento residual se

recoge y suspende en Tris 0,2 M, hidrocloreuro de guanidina 6 M, ditioeritrita (DTE) 0,001 M, imidazol 0,02 M. Los cuerpos de inclusión se disuelven bajo agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, la proteína bruta se encuentra en el sobrenadante y se puede aplicar directamente en una columna de Ni-agarosa de 3 ml. Los pasos siguientes deberían realizarse en la cámara frigorífica entre +4 y +6°C. Primero se lava la columna con tampón Tris 0,2 M, hidrocloreuro de guanidina 6 M, ditioeritrita (DTE) 0,001 M, imidazol 0,02 M, pH 7,5, hasta que la extinción haya alcanzado la línea de base. A partir de aquí se puede obtener la rCGBP181 de diferentes maneras: 1. en forma de proteína desnaturalizada disuelta en hidrocloreuro de guanidina 6 M o en urea 6 M y 2. en forma de proteína nativa soluble en tampones de concentración fisiológica. No obstante, en el segundo caso el rendimiento es menor.

Purificación según el procedimiento 1 (desnaturalizada):

La proteína rCGBP181 se eluye de la Ni-NTA-agarosa con un gradiente de imidazol de 0 a 0,5 M en el tampón Tris 0,2 M, hidrocloreuro de guanidina 6 M, ditioeritrita (DTE) 0,001 M, imidazol 0,02 M, pH 7,5, como base. La rCGBP181 se separa de la columna a una concentración de imidazol de 0,2 a 0,3 M. La proteína así obtenida se dializa contra Tris 0,2 M, urea 6 M, ditioeritrita (DTE) 0,001 M, pH 7,5, y se congela. Si se dializa contra un tampón fisiológico, la rCGBP181 así purificada precipita.

Purificación según el procedimiento 2 (nativa):

En este procedimiento, la concentración de hidrocloreuro de guanidina se lleva, mediante un gradiente, desde 6 molar en la Ni-NTA-agarosa con la rCGBP181 unida hasta 0 molar de hidrocloreuro de guanidina. La base es el tampón Tris 0,2 M, NaCl 0,5 M, ditioeritrita (DTE) 0,001 M, imidazol 0,02 M, pH 7,5. Se escogió una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Para la elución se aplicó después un gradiente de imidazol de 0 a 0,5 molar en el tampón Tris 0,2 M, NaCl 0,5 M, ditioeritrita (DTE) 0,001 M, pH 7,5, como base. También en este caso eluyó una proporción importante de la proteína unida (20%) a una concentración de imidazol de 0,2 a 0,3 molar. Este eluato de rCGBP181 nativa permaneció disuelto en este tampón y también después de la diálisis contra PBS. El inconveniente reside, sin embargo, en que en estas condiciones, aproximadamente un 80% de la rCGBP181 unida a la Ni-NTA-agarosa quedó retenido en la columna y solo se pudo recuperar posteriormente en las condiciones desnaturalizantes del procedimiento 1. Es decir, el rendimiento del procedimiento 2 usado proporcionó tan solo un 20% de rCGBP181 nativa soluble en tampones fisiológicos.

### Ejemplo 2: Detección de agentes patógenos mediante PCR anidada:

Para la detección de agentes patógenos se usa sangre humana reciente heparinizada que contiene como agente patógeno *Streptococcus pyogenes* con  $10^3$ /ml unidades formadoras de colonias. El ADN se aísla por absorción a una matriz de unión a ADN con kits comerciales para el aislamiento de ADN total a partir de líquidos corporales según las instrucciones modificadas de los fabricantes. Para ello se añaden a 100 µl de sangre infectada en tubos Eppendorf 200 µl del tampón de lisis total que contiene proteinasa K y SDS. La mezcla se incuba durante 30 min a 37°C y después se calienta durante 20 min a 95°C. Tras el enfriamiento se añaden 20 µg de mutanolisina y se incuba durante otros 60 min a 37°C. Después de la centrifugación, la mezcla se aplica sobre las columnas de centrifugación con la matriz de unión a ADN y el ADN se purifica según las instrucciones del fabricante. El ADN purificado se suspende en un volumen final de 100 µl de tampón Tris 0,01 molar, pH 7,5, o en la misma cantidad del tampón del fabricante. Para la detección de los agentes patógenos se construyeron cebadores para la identificación del gen de la estreptolisina O (slo).

Primera PCR. Amplificación de un fragmento de 465 pb

Cebador directo 1: 5'-AGCATACAAGCAAATTTTTTACACCG  
Cebador inverso 2: 5'-GTTCTGTTATTGACACCCGCAATT  
Concentración de los cebadores 1mg/ml

Preparación: 5 µl de aislado de ADN  
0,5 µl del cebador directo 1  
0,5 µl del cebador inverso 2  
14 µl de agua destilada  
total 25 µl en el kit "Ready to go" (Amersham-Pharmacia)

Reacción:

5 min a 95°C  
40 ciclos (30 s 95°C, 30 s 51°C, 3 min 72°C, 1 x 7 min 72°C)

En la figura 3 se representa la primera PCR del ADN de estreptococo en sangre humana (se separan en cada caso

10 µl de la preparación de 25 µl: 1) Preparación de PCR con 5 µl de ADN molde; 2) preparación con 5 µl de molde diluido 1:10; 3) control positivo: 0,2 µl de ADN de estreptococo como molde en ausencia de ADN eucariota de sangre; ST) patrón del peso molecular).

- 5 Resultado: La primera PCR primaria no proporciona ninguna reacción positiva. Por ello se realizó después una segunda PCR (PCR anidada).

Segunda PCR, PCR anidada. Amplificación de un fragmento de 348 pb contenido dentro del fragmento anterior

- 10 Cebador directo 3: 5'-CCTTCCTAATAATCCTGCGGATGT  
Cebador inverso 4: 5'-CTGAAGGTAGCATTAG TCTTTGATAACG  
Concentración de los cebadores: 1 mg/ml

- Preparación: 5 µl de la PCR1, muestra 1, fig. 1  
15 0,5 µl del cebador directo 1  
0,5 µl del cebador inverso 2  
14 µl de agua destilada  
total 25 µl en el kit "Ready to go" (Amersham-Pharmacia)

- 20 Reacción:  
  
5 min a 95°C  
40 ciclos (30 s 95°C, 30 s 54°C, 3 min 72°C, 1 x 7 min 72°C)

- 25 En la figura 4 se muestra la PCR anidada con los productos de PCR de la preparación de PCR primaria de la figura 3 como molde. Las muestras equivalen a las de la figura 3.

- Resultado: Mediante la PCR anidada se amplifica el fragmento de ADN slo deseado a una concentración de 100 células de estreptococo por 100 µl de sangre (muestra 1). Esto equivale, al usar 5 µl en la primera PCR (fig. 3), a aproximadamente 5 a 10 moldes. A la dilución 1:10 (muestra 2) se llega al límite de la sensibilidad (0,5 a 1 molde).

- De estos experimentos se desprende que para una detección eficaz de agentes patógenos en sangre por PCR se ha de aislar el ADN total de al menos 1 a 5 ml de sangre. La concentración de ADN total, sin embargo, es entonces demasiado alta para usarla directamente en una PCR.

- 35 Otras determinaciones de ácidos nucleicos específicos de agentes patógenos sin paso de amplificación mediante la detección directa del ADN bacteriano, por ejemplo mediante hibridación de ADN, son igualmente demasiado poco sensibles, lo que se debe sobre todo al gran exceso de ADN humano frente al ADN bacteriano. En este caso, además, los procesos competitivos en el análisis del ADN, así como la pequeña cantidad de ADN bacteriano, se consideran un obstáculo para el análisis cualitativo y cuantitativo. Los procedimientos habituales para el aislamiento de ADN enriquecen el ADN total de un líquido corporal, de manera que la relación entre el ADN del huésped y el ADN microbiano puede encontrarse entre 1:10<sup>-6</sup> y 1:10<sup>-8</sup>. A partir de esta diferencia es fácil de comprender la dificultad que supone la detección de ADN microbiano en líquidos corporales.

45 **Ejemplo 3: Determinación de las propiedades de unión de la rCGBP181:**

- En experimentos de retardo en gel se estudió tanto la unión de la proteína rCGBP181 desnaturalizada como la de la proteína nativa a moléculas de ADN metiladas y no metiladas con motivos CpG. Como ADN de ensayo se usó el plásmido pUC18 de *E. coli* que llevaba insertado un segmento génico de la proteína M de *Streptococcus dysgalactiae* *supsp. equisimilis* (Geyer y col., FEMS Immunol. Med. Microbiol. 26:11-24, 1999). La preparación de plásmido se dividió, y una mitad se metiló con el kit CpG-Methylase de New England BioLabs. Ambas preparaciones se mezclaron con rCGBP181 (nativa y desnaturalizada) y se separaron por electroforesis en gel de agarosa. Los resultados se desprenden de las figuras 5 y 6. Tanto la forma nativa como la desnaturalizada de la rCGBP181 mostraron una mayor afinidad por el ADN plasmídico no metilado, lo que confirma la propiedad de unión selectiva a ADN no metilado rico en CpG.

- Descripción del experimento de retardo en gel según la figura 5: Se mezclaron respectivamente 5 µl (72 ng) de ADN de pUC18emm metilado y 1 µl (142 ng) del no metilado con 5 µl (0,5 µg) de rCGBP181 nativa y se llevaron a un volumen de 35 µl con el tampón Tris 0,01 M, NaCl 0,08 M, EDTA 0,001 M, DTE 0,005 M, 5% de glicerol, pH 7,8. Tras una incubación de 30 min a 20°C se separaron las mezclas por electroforesis en agarosa al 1,5%. En los carriles 1 y 3 se aplicó ADN metilado y en los carriles 2 y 4, ADN no metilado. En los carriles 1 y 2 se mezcló el ADN con la rCGBP181 nativa. El carril 2 muestra que el pUC18emm no metilado interactúa con la rCGBP181, mientras que, por el contrario, la rCGBP181 no mostró interacción alguna con el pUC18emm metilado (carril 1). Los carriles 4 y 5 representan los plásmidos sin adición de rCGBP181 como controles.

Descripción del experimento de retardo en gel de la figura 6 con pUC18emm no metilado y metilado después de la incubación con rCGBP181 desnaturalizada. Las concentraciones corresponden a las de la figura 5. En los carriles 1 y 3 se aplicó ADN metilado y en los carriles 2 y 4, ADN no metilado. En los carriles 1 a 4 el ADN se mezcló con dos lotes diferentes de rCGBP181 desnaturalizada. Los carriles 2 y 4 muestran que el pUC18emm no metilado también interactúa con la rCGBP181 desnaturalizada, mientras que, por el contrario, la rCGBP181 no mostró interacción alguna con el pUC18emm metilado (carriles 1 y 3). El carril 5 representa el pUC18emm sin rCGBP181 como control.

#### **Ejemplo 4: Unión y separación de una mezcla de ADN de timo de ternera y ADN bacteriano con CGBP181 inmovilizada.**

Se acopló CGBP181 purificada a Aminohexyl-Sepharose (Amersham-Biosciences) mediante glutaraldehído según las instrucciones de Cambiasso y col. (Cambiasso, C. y col., *Immunochemistry* 12:273-278, 1975). La concentración de proteína inmovilizada ascendió a 0,3 mg por mililitro de Sepharose. Se introdujeron 300 µl de Sepharose en un tubo de filtro de centrifuga con material de fritada inerte que no absorbe ADN ni proteínas pero retiene la Sepharose.

Se disolvieron 200 ng de ADN de timo de ternera y 25 ng de pUC18emm en 100 µl de Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, y se colocaron en la columna así preparada. Después de cada paso se centrifugó el líquido durante 0,5 min a 14.000 rpm en una centrifuga Eppendorf en un nuevo tubo Eppendorf respectivamente. De este modo se aumentó la concentración de NaCl de 0 a 1 M en pasos de dos en dos. En cada tubo se realizó una precipitación de ADN añadiendo y mezclando 10 µl de acetato 4 M, pH 4,5, y 250 µl de etanol abs. y centrifugando durante 15 min a 14.000 rpm. Después se decantó el sobrenadante, y el precipitado se lavó con 300 µl de etanol al 70%. Tras la decantación, el residuo se secó durante 5 min en una centrifuga de vacío y a continuación se suspendió en 15 µl de agua dest. (apta para PCR). Por una parte, se midió la extinción a 254 nm de 10 µl, respectivamente, de las muestras (figura 7). Por otra, se realizó con 3 µl, respectivamente, de cada muestra una PCR con cebadores de secuencia para PUC18 (figura 8).

El resultado (figuras 7, 8) muestra que el ADN eucariota de timo de ternera se lava de la columna al principio entre NaCl 0 y 0,1 M, mientras que el ADN procariota (pUC18emm) eluye en la fracción de NaCl 0,3 M. Esto muestra que el ADN eucariota presenta una menor afinidad por la CGBP181 y que, por tanto, se ha logrado una clara separación de ambas fracciones de ADN.

**Ejemplo 5: Mejora de las propiedades de unión de la proteína CGBP181 que resulta de la unión indirecta de esta proteína a una matriz a través de un espaciador.**

Para estudiar las propiedades de unión se enriqueció ADN procariota a partir de una mezcla de ADN de *Staphylococcus aureus* y ADN humano usando la proteína CGBP181 acoplada directamente a CNBr-Sepharose o usando la proteína CGBP181 acoplada indirectamente a través de un espaciador de diaminoxililo (AH) a Sepharose (en lo sucesivo AH-Sepharose).

Primero, tras añadir glutaraldehído, se incubó la AH-Sepharose durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavó la AH-Sepharose con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 molar. Luego se colocaron 0,24 mg de la proteína CGBP181 sobre la matriz. La unión de la proteína CGBP181 a la AH-Sepharose se logró mediante una incubación de 2 horas a temperatura ambiente. El exceso de proteína CGBP181 se eliminó.

Tras lavar a continuación la CGBP181-AH-Sepharose con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 molar y añadir glicina 0,1 molar, la CGBP181-AH-Sepharose se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente para saturar los sitios de unión libres. Después se volvió a lavar la CGBP181-AH-Sepharose con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 molar. Para la reducción de la base de Schiff y la estabilización de la unión se añadió borohidruro de sodio a la CGBP181-AH-Sepharose y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

Después se lavó la CGBP181-AH-Sepharose con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 molar.

La estabilidad de la CGBP181-AH-Sepharose al almacenamiento a 4°C se alcanza mediante la adición de etanol al 20%. Después se repartió la CGBP181-AH-Sepharose en columnas. Las columnas preparadas con la CGBP181-AH-Sepharosa se lavaron a continuación con tampón Tris y estuvieron a disposición para la separación/enriquecimiento de ADN que contiene motivos CpG no metilados.

2) Enriquecimiento de la mezcla de ADN, elución siguiente del ADN procariota y determinación de la concentración del ADN procariota mediante PCR

La mezcla de ADN se componía en cada caso de 330 ng de ADN humano o de 150 ng de ADN procariota (ADN de *Staphylococcus aureus*). La mezcla de ADN se aplicó sobre las columnas preparadas con CNBr-Sepharose o con AH-Sepharose y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Después, las columnas se centrifugaron y se

lavaron con 100 µl de tampón Tris (10 µM, pH 7). Los pasos de lavado y de centrifugación se repitieron 5 veces.

El sobrenadante se retiró con cuidado, y a continuación se aplicaron respectivamente 100 µl de tampón de elución (tampón Tris 10 µM, NaCl 0,5 M, pH 7) sobre las columnas y se centrifugaron. El paso de elución se repitió 5 veces.

5 Luego se precipitaron las fracciones individuales de cada muestra mediante la adición de 10 µl de acetato sódico 3 M y 250 µl de etanol y mezclado y centrifugación siguientes (15 min a 15.000 g). El sobrenadante se decantó con cuidado y el sedimento se lavó con 1 µl de etanol (al 70%) y se centrifugó durante 5 minutos a 15.000 g. A continuación se volvió a retirar el sobrenadante, el sedimento se secó en una centrífuga de vacío y se suspendió en 30 µl de agua DEPC. De ellos se usaron respectivamente 5 µl para la detección por PCR.

10 Para la PCR se usaron cebadores universales para el gen ARN 16S. Una vez realizada la PCR se aplicaron respectivamente 15 µl de las fracciones individuales en un gel de agarosa al 2%.

15 La figura 9 (unión directa de la proteína CGBP181 a CNBr-Sepharose) y la figura 10 (unión indirecta de la proteína CGBP181 a Sepharose a través de un espaciador (AH)) muestran los resultados de la PCR para las fracciones individuales. Se observa claramente que mediante el uso del espaciador AH se pudo enriquecer más ADN procarionta (fracción 1, fracción de elución). Esta mejora característica de las propiedades de unión se puede aprovechar para los procedimientos de acuerdo con la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> SIRS-Lab GmbH
- 5 <120> Procedimiento para el enriquecimiento y/o la separación de ADN procariota mediante una proteína que se une específicamente a ADN que contiene motivos CpG no metilados
- <130> Pat 3696/29-PCT
- 10 <140>
- <141>
- <160> 8
- 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 543
- <212> ADN
- 20 <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(561)
- 25 <400> 1

```

ggt gga ggg cgc aag agg cct gtc cct gat cca aac ctg cag cgc cgg 48
Gly Gly Gly Arg Lys Arg Pro Val Pro Asp Pro Asn Leu Gln Arg Arg
 1                    5                      10                      15

gca ggg tca ggg aca ggg gtt ggg gcc atg ctt gct cgg ggc tct gct 96
Ala Gly Ser Gly Thr Gly Val Gly Ala Met Leu Ala Arg Gly Ser Ala
                20                    25                      30

tcg ccc cac aaa tcc tct ccg cag ccc ttg gtg gcc aca ccc agc cag 144
Ser Pro His Lys Ser Ser Pro Gln Pro Leu Val Ala Thr Pro Ser Gln
                35                    40                      45

cat cac cag cag cag cag cag cag atc aaa cgg tca gcc cgc atg tgt 192
His His Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ile Lys Arg Ser Ala Arg Met Cys
                50                    55                      60

ggt gag tgt gag gca tgt cgg cgc act gag gac tgt ggt cac tgt gat 240
Gly Glu Cys Glu Ala Cys Arg Arg Thr Glu Asp Cys Gly His Cys Asp
 65                    70                      75                      80

ttc tgt cgg gac atg aag aag ttc ggg ggc ccc aac aag atc cgg cag 288
Phe Cys Arg Asp Met Lys Lys Phe Gly Gly Pro Asn Lys Ile Arg Gln
                85                    90                      95

aag tgc cgg ctg cgc cag tgc cag ctg cgg gcc cgg gaa tcg tac aag 336
Lys Cys Arg Leu Arg Gln Cys Gln Leu Arg Ala Arg Glu Ser Tyr Lys
                100                   105                      110

tac ttc cct tcc tcg ctc tca cca gtg acg ccc tca gag tcc ctg cca 384
Tyr Phe Pro Ser Ser Leu Ser Pro Val Thr Pro Ser Glu Ser Leu Pro
                115                   120                      125

```

ES 2 384 571 T3

```

agg ccc cgc cgg cca ctg ccc acc caa cag cag cca cag cca tca cag      432
Arg Pro Arg Arg Pro Leu Pro Thr Gln Gln Gln Pro Gln Pro Ser Gln
    130                      135                      140

aag tta ggg cgc atc cgt gaa gat gag ggg gca gtg gcg tca tca aca      480
Lys Leu Gly Arg Ile Arg Glu Asp Glu Gly Ala Val Ala Ser Ser Thr
145                      150                      155                      160

gtc aag gag cct cct gag gct aca gcc aca cct gag cca ctc tca gat      528
Val Lys Glu Pro Pro Glu Ala Thr Ala Thr Pro Glu Pro Leu Ser Asp
                      165                      170                      175

gag gac cta cct ctg                                          543
Glu Asp Leu Pro Leu
                      180

```

<210> 2  
 <211> 181  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

Gly Gly Gly Arg Lys Arg Pro Val Pro Asp Pro Asn Leu Gln Arg Arg
  1          5          10

Ala Gly Ser Gly Thr Gly Val Gly Ala Met Leu Ala Arg Gly Ser Ala
          20          25          30

Ser Pro His Lys Ser Ser Pro Gln Pro Leu Val Ala Thr Pro Ser Gln
          35          40          45

His His Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ile Lys Arg Ser Ala Arg Met Cys
  50          55          60

Gly Glu Cys Glu Ala Cys Arg Arg Thr Glu Asp Cys Gly His Cys Asp
  65          70          75          80

Phe Cys Arg Asp Met Lys Lys Phe Gly Gly Pro Asn Lys Ile Arg Gln
          85          90          95

Lys Cys Arg Leu Arg Gln Cys Gln Leu Arg Ala Arg Glu Ser Tyr Lys
          100          105          110

Tyr Phe Pro Ser Ser Leu Ser Pro Val Thr Pro Ser Glu Ser Leu Pro
          115          120          125

Arg Pro Arg Arg Pro Leu Pro Thr Gln Gln Gln Pro Gln Pro Ser Gln
          130          135          140

Lys Leu Gly Arg Ile Arg Glu Asp Glu Gly Ala Val Ala Ser Ser Thr
145                      150                      155                      160

Val Lys Glu Pro Pro Glu Ala Thr Ala Thr Pro Glu Pro Leu Ser Asp
                      165                      170                      175

Glu Asp Leu Pro Leu

```

# ES 2 384 571 T3

|    |                                                                |    |
|----|----------------------------------------------------------------|----|
| 5  | <210> 3<br><211> 28<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
|    | <220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador |    |
|    | <400> 3                                                        |    |
| 10 | ggatccggtg gagggcgcaa gaggcctg                                 | 28 |
|    | <210> 4<br><211> 27<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 15 | <220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador |    |
|    | <400> 4                                                        |    |
| 20 | aagcttagag gtaggtcctc atctgag                                  | 27 |
|    | <210> 5<br><211> 26<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 25 | <220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador |    |
|    | <400> 5                                                        |    |
| 30 | agcatacaag caaattttt acaccg                                    | 26 |
|    | <210> 6<br><211> 24<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 35 | <220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador |    |
|    | <400> 6                                                        |    |
| 40 | gttctgttat tgacaccgc aatt                                      | 24 |
|    | <210> 7<br><211> 24<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 45 | <220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador |    |
|    | <400> 7                                                        |    |
| 50 | ccttctaataatcctgcgg atgt                                       | 27 |
|    | <210> 8<br><211> 28<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 55 |                                                                |    |
| 60 |                                                                |    |

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

5 <400> 8

ctgaaggtag cattagtctt tgataacg

27

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la separación y/o el enriquecimiento de ADN procariota, con los pasos de:
  - 5 a) poner al menos un ADN procariota en solución en contacto con una proteína que se una específicamente al ADN procariota y que presente una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID NO: 2 de modo que se forme un complejo proteína/ ADN, siendo la proteína capaz de reconocer motivos CpG no metilados, y
  - b) separar el complejo.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que le sigue a la separación un paso para separar el ADN de la proteína a partir del complejo.
3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína está unida a un soporte.
- 15 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la proteína está unida directamente al soporte.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la proteína está unida al soporte a través de un anticuerpo dirigido contra la proteína.
- 20 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la proteína está unida al soporte a través de un espaciador.
- 25 7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que se usa un resto diaminohexano como espaciador.
8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el soporte está configurado en forma de matriz, micropartículas o membrana.
- 30 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que se usa Sepharose como matriz.
10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que la separación se lleva a cabo mediante un anticuerpo o antisuero dirigido contra la proteína.
- 35 11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la separación se lleva a cabo mediante electroforesis.
12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que la solución contiene una mezcla de ADN eucariota y procariota.
- 40 13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que en el caso del ADN procariota se trata de ADN bacteriano.
- 45 14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13, en el que la solución es un líquido corporal o deriva de él, en particular sangre entera, suero, plasma, preparaciones celulares de sangre entera, orina, fluidos, líquido pleural, pericárdico, peritoneal, sinovial y lavado broncoalveolar.
- 50 15. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 12 a 14, en el que la separación se logra mediante un filtro que recoge por filtración los complejos ADN/ proteína correspondientes y en el que la proteína se encuentra inmovilizada en una matriz filtrante.
- 55 16. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 15 para la aplicación en la técnica medioambiental, la gestión del agua y de aguas residuales y la técnica climática.
17. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 15, en el que, adicionalmente, después del paso b) se amplifica el ADN procariota en el paso c).
- 60 18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, con los pasos:
  - a) aislamiento del ADN procariota a partir del complejo proteína/ ADN,
  - b) desnaturalización del ADN de cadena doble,
  - c) hibridación de las cadenas sencillas del ADN con cebadores complementarios,
  - d) generación de fragmentos de cadena doble mediante una reacción con polimerasas y

e) repetición de estos pasos hasta obtener el grado de amplificación deseado.

19. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, con lo pasos:

- 5 a) clonación de las secuencias de ADN procariotas aisladas en vectores,  
b) transformación de células huésped adecuadas con estos vectores,  
c) cultivo de estas células transformadas,  
d) aislamiento de los vectores a partir de estas células y  
e) aislamiento del ADN.

10 20. Uso de un kit que contiene al menos una proteína de unión específica a ADN procariota que presenta una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID NO: 2 para la separación y/o el enriquecimiento de ADN procariota mediante un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 19.

15 21. Procedimiento para la separación y/o el enriquecimiento de ADN genómico no metilado a partir de una mezcla de ADN genómico no metilado y ADN genómico metilado, con los pasos de:  
a) poner un ADN genómico no metilado en solución en contacto con una proteína que se una específicamente a ADN no metilado y que presente una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID NO: 2 de modo que se forme un complejo proteína/ ADN y  
20 b) separar el complejo.

22. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 21 para el diagnóstico de enfermedades que presentan un patrón de metilación específico del ADN genómico, en especial de cánceres.

```

                                10      20      30      40      50
CGBP656      1  MEGDGSDFEP PDAGEDSKSE NGENAPIYCI CRKPDINCFM IGDNCNEWF
CGBP241      1  -----
CGBP181      1  -----

                                60      70      80      90      100
CGBP656     51  HGDCIRITEK MAKAIREWYC RECREKDPKL EJRVRHKKSR ERDGNERNSS
CGBP241     51  -----
CGBP181     51  -----

                                110     120     130     140     150
CGBP656    101  EPRDEGGGRK RPVPDFNLQR RAGSGTGVGA MLARGSASPH KSSPQPLVAT
CGBP241    101  -----GGGRK RPVPDFNLQR RAGSGTGVGA MLARGSASPH KSSPQPLVAT
CGBP181    101  -----CGGRK RPVPDFNLQR RAGSGTGVGA MLARGSASPH KSSPQPLVAT

                                160     170     180     190     200
CGBP656    151  PSQHQQQQQ QIKRSARMCG ECEACRRTED CGHCDFCRDM KKFGGPNKIR
CGBP241    151  PSQHQQQQQ QIKRSARMCG ECEACRRTED CGHCDFCRDM KKFGGPNKIR
CGBP181    151  PSQHQQQQQ QIKRSARMCG ECEACRRTED CGHCDFCRDM KKFGGPNKIR

                                210     220     230     240     250
CGBP656    201  QKCRLRQQQL RARESYKYFP SLSLSPVTPSE SLPRPRRPLP TQQQPQPSQK
CGBP241    201  QKCRLRQQQL RARESYKYFP SLSLSPVTPSE SLPRPRRPLP TQQQPQPSQK
CGBP181    201  QKCRLRQQQL RARESYKYFP SLSLSPVTPSE SLPRPRRPLP TQQQPQPSQK

                                260     270     280     290     300
CGBP656    251  LGRIREDEGA VASSTVKEPP EATATPEPLS DEDLPLDPLD YQDFCAGAFD
CGBP241    251  LGRIREDEGA VASSTVKEPP EATATPEPLS DEDLPLDPLD YQDFCAGAFD
CGBP181    251  LGRIREDEGA VASSTVKEPP EATATPEPLS DEDLPL-----

                                310     320     330     340     350
CGBP656    301  DNGLFWMSDT EESFFLDEAL BKRAVKVKHV KRREKKSEKK KEERYKRHRQ
CGBP241    301  DNGLFWMSDT EESFFLDPAL RRAVKVKHV KRREKKSEKK KEERYK----

                                360     370     380     390     400
CGBP656    351  KQKHKDKWKH FERADAKDPA SLPQCLGPGC VRPAQPSKY CSDDCGMKLA

                                410     420     430     440     450
CGBP656    401  ANRIYEILPQ RIQQWQSPC IAEEHGKLL ERIRREQQA RTRLOEMERE

                                460     470     480     490     500
CGBP656    451  FHELEAILR AKQQAVREDE ESNEGSDDT DLQIFCVSCG RFINPRVALR

                                510     520     530     540     550
CGBP656    501  HMERCYAKYE SQTSGSMYP TRIEGATRLF CDVYNPQSKT YCKRLQVLCF

                                560     570     580     590     600
CGBP656    551  EBSRDPKQVA DEVCGCPLVR DVFELTGDFC RLPKQCNRH YCWEKLRRAE

                                610     620     630     640     650
CGBP656    601  VDLEVRVWVY KLDELFEQER NVRTAMTNRA GLLALMLHQT IQHDPLTTDL

                                660     670     680     690     700
CGBP656    651  RSSADR.....

```

Fig. 1

Fig. 2 (continuación)

|     |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |     |     |     |     |
|-----|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     | 549  |     | 558  |     | 567  |     | 576  |     | 585  |     | 594  |     |     |     |     |     |
| TGT | GGT | CAC  | TGT | GAT  | TTC | TGT  | CGG | GAC  | ATG | AAG  | AAG | TTC  | GGG | GGC | CCC | AAC | AAG |
| C   | G   | H    | C   | D    | F   | C    | R   | D    | M   | K    | K   | F    | G   | G   | P   | N   | K   |
| C   | G   | H    | C   | D    | F   | C    | R   | D    | M   | K    | K   | F    | G   | G   | P   | N   | K   |
|     |     | 603  |     | 612  |     | 621  |     | 630  |     | 639  |     | 648  |     |     |     |     |     |
| ATC | CGG | CAG  | AAG | TGC  | CGG | CTG  | CGC | CAG  | TGC | CAG  | CTG | CGG  | GCC | CGG | GAA | TCG | TAC |
| I   | R   | Q    | K   | C    | R   | L    | R   | Q    | C   | Q    | L   | R    | A   | R   | E   | S   | Y   |
| I   | R   | Q    | K   | C    | R   | L    | R   | Q    | C   | Q    | L   | R    | A   | R   | E   | S   | Y   |
|     |     | 657  |     | 666  |     | 675  |     | 684  |     | 693  |     | 702  |     |     |     |     |     |
| AAG | TAC | TTC  | CCT | TCC  | TCG | CTC  | TCA | CCA  | GTG | ACG  | CCC | TCA  | GAG | TCC | CTG | CCA | AGG |
| K   | Y   | F    | F   | S    | S   | L    | S   | P    | V   | T    | P   | S    | E   | S   | L   | P   | R   |
| K   | Y   | F    | F   | S    | S   | L    | S   | P    | V   | T    | P   | S    | E   | S   | L   | P   | R   |
|     |     | 711  |     | 720  |     | 729  |     | 738  |     | 747  |     | 756  |     |     |     |     |     |
| CCC | CGC | CGG  | CCA | CTG  | CCC | ACC  | CAA | CAG  | CAG | CCA  | CAG | CCA  | TCA | CAG | AAG | TTA | GGG |
| P   | R   | R    | P   | L    | P   | T    | Q   | Q    | Q   | P    | Q   | P    | S   | Q   | K   | L   | G   |
| P   | R   | R    | P   | L    | P   | T    | Q   | Q    | Q   | P    | Q   | P    | S   | Q   | K   | L   | G   |
|     |     | 765  |     | 774  |     | 783  |     | 792  |     | 801  |     | 810  |     |     |     |     |     |
| CGC | ATC | CGT  | GAA | GAT  | GAG | GGG  | GCA | GTG  | GCG | TCA  | TCA | ACA  | GTC | AAG | GAG | CCT | CCT |
| R   | I   | R    | E   | D    | E   | G    | A   | V    | A   | S    | S   | T    | V   | K   | E   | P   | P   |
| R   | I   | R    | E   | D    | E   | G    | A   | V    | A   | S    | S   | T    | V   | K   | E   | P   | P   |
|     |     | 819  |     | 828  |     | 837  |     | 846  |     | 855  |     | 864  |     |     |     |     |     |
| GAG | GCT | ACA  | GCC | ACA  | CCT | GAG  | CCA | CTC  | TCA | GAT  | GAG | GAC  | CTA | CCT | CTG | GAT | CCT |
| E   | A   | T    | A   | T    | P   | E    | P   | L    | S   | D    | E   | D    | L   | P   | L   | D   | P   |
| E   | A   | T    | A   | T    | P   | E    | P   | L    | S   | D    | E   | D    | L   | P   | L   | D   | P   |
|     |     | 873  |     | 882  |     | 891  |     | 900  |     | 909  |     | 918  |     |     |     |     |     |
| GAC | CTG | TAT  | CAG | GAC  | TTC | TGT  | GCA | GGG  | GCC | TTT  | GAT | GAC  | ATY | GGC | CTG | CCC | TGG |
| D   | L   | Y    | Q   | D    | F   | C    | A   | G    | A   | Y    | D   | D    | N   | G   | L   | P   | W   |
|     |     | 927  |     | 936  |     | 945  |     | 954  |     | 963  |     | 972  |     |     |     |     |     |
| ATG | AGC | GAC  | ACA | GAA  | GAG | TCC  | CCA | TTC  | CTG | GAC  | CCC | GCG  | CTG | CGG | AAG | AGG | GCA |
| M   | S   | D    | T   | E    | E   | S    | P   | F    | L   | D    | P   | A    | L   | R   | K   | R   | A   |
|     |     | 981  |     | 990  |     | 999  |     | 1008 |     | 1017 |     | 1026 |     |     |     |     |     |
| GTG | AAA | GTG  | AAG | CAT  | GTG | AAG  | CGT | CGG  | GAG | AAG  | AAG | TCT  | GAG | AAG | AAG | AAG | GAG |
| V   | K   | V    | K   | H    | V   | K    | R   | R    | E   | K    | K   | S    | E   | K   | K   | K   | E   |
|     |     | 1035 |     | 1044 |     | 1053 |     | 1062 |     | 1071 |     | 1080 |     |     |     |     |     |
| GAG | CGA | TAC  | AAG | CGG  | CAT | CGG  | CAG | AAG  | CAG | AAG  | CAC | AAG  | GAT | AAA | TGG | AAA | CAC |
| E   | R   | Y    | K   | R    | H   | R    | Q   | K    | Q   | K    | H   | K    | D   | E   | W   | K   | H   |
|     |     | 1089 |     | 1098 |     | 1107 |     | 1116 |     | 1125 |     | 1134 |     |     |     |     |     |
| CCA | GAG | AGG  | GCT | GAT  | GCC | AAG  | GAC | CCT  | GCG | TCA  | CTG | CCC  | CAG | TGC | CTG | GGG | CCC |
| P   | E   | R    | A   | D    | A   | K    | D   | F    | A   | S    | L   | P    | Q   | C   | L   | G   | P   |

Fig. 2 (continuación)

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GGC | TGT | GTG | CGC | CCC | GCC | CAG | CCC | AGC | TCC | AAG | TAT | TGC | TCA | GAT | GAC | TGT | GGC |
| G   | C   | V   | R   | P   | A   | Q   | P   | S   | S   | K   | Y   | C   | S   | D   | D   | C   | G   |
| ATG | AAG | CTG | GCA | GCC | AAC | CGC | ATC | TAC | GAG | ATC | CTC | CCC | CAG | CGC | ATC | CAG | CAG |
| M   | K   | L   | A   | A   | N   | R   | I   | Y   | E   | I   | L   | P   | Q   | R   | I   | Q   | Q   |
| TGG | CAG | CAG | AGC | CCT | TGC | ATT | GCT | GAA | GAG | CAC | GGC | AAG | AAG | CTG | CTC | GAA | CGC |
| W   | Q   | Q   | S   | P   | C   | I   | A   | E   | E   | H   | G   | K   | K   | L   | L   | E   | R   |
| ATT | CGC | CGA | GAG | CAG | CAG | AGT | GCC | CGC | ACC | CGC | CTT | CAG | GAA | ATG | GAA | CGC | CGA |
| I   | R   | R   | E   | Q   | Q   | S   | A   | R   | T   | R   | L   | Q   | E   | M   | E   | R   | R   |
| TTG | CAT | GAG | CTT | GAG | GCC | ATC | ATT | CTA | CGT | GCC | AAG | CAG | CAG | GCT | GTG | CGC | GAG |
| F   | H   | E   | L   | E   | A   | I   | I   | L   | R   | A   | K   | Q   | Q   | A   | V   | R   | E   |
| GAT | GAG | GAG | AGC | AAC | GAG | GGT | GAC | AGT | GAT | GAC | ACA | GAC | CTG | CAG | ATC | TTC | TGT |
| D   | E   | E   | S   | N   | E   | G   | D   | S   | D   | D   | T   | D   | L   | Q   | I   | F   | C   |
| GTT | TCC | TGT | GGG | CAC | CCC | ATC | AAC | CCA | CGT | GTT | GCC | TTG | CGC | CAC | ATG | GAG | CGC |
| V   | S   | C   | G   | H   | P   | I   | N   | P   | R   | V   | A   | L   | R   | H   | M   | E   | R   |
| TGC | TAC | GCC | AAG | TAT | GAG | AGC | ÇAG | ACG | TCC | TTT | GGG | TCC | ATG | TAC | CCC | ACA | CGC |
| C   | Y   | A   | K   | Y   | E   | S   | Q   | T   | S   | F   | G   | S   | M   | Y   | P   | T   | R   |
| ATT | GAA | GGG | GCC | ACA | CGA | CTC | TTC | TGT | GAT | GTG | TAT | AAT | CCT | CAG | AGC | AAA | ACA |
| I   | E   | G   | A   | T   | R   | L   | F   | C   | D   | V   | Y   | N   | P   | Q   | S   | K   | T   |
| TAC | TGT | AAG | CGG | CTC | CAG | GTG | CTG | TGC | CCC | GAG | CAC | TCA | CGG | GAC | CCC | AAA | GTG |
| Y   | C   | K   | R   | L   | Q   | V   | L   | C   | P   | E   | H   | S   | R   | D   | P   | K   | V   |
| CCA | GCT | GAC | GAG | GTA | TGC | GGG | TGC | CCC | CTT | GTA | CGT | GAT | GTC | TTT | GAG | CTC | ACG |
| P   | A   | D   | E   | V   | C   | G   | C   | P   | L   | V   | R   | D   | V   | F   | E   | L   | T   |
| GGT | GAC | TTC | TGC | CGC | CTG | CCC | AAG | CGC | CAG | TGC | AAT | CGC | CAT | TAC | TGC | TGG | GAG |
| G   | D   | F   | C   | R   | L   | P   | K   | R   | Q   | C   | N   | R   | B   | Y   | C   | W   | E   |

Fig. 2 (continuación)

|     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |     |     |     |     |     |
|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | 1791 |     | 1800 |     | 1809 |     | 1818 |     | 1827 |     | 1836 |     |     |     |     |     |     |
| AAG | CTG  | CGG | CGT  | GCG | GAA  | GTG | GAC  | TTG | GAG  | CGC | GTG  | CGT | GTG | TGG | TAC | AAG | CTG |
| K   | L    | R   | R    | A   | E    | V   | D    | L   | E    | R   | V    | R   | V   | W   | Y   | K   | L   |
|     | 1845 |     | 1854 |     | 1863 |     | 1872 |     | 1881 |     | 1890 |     |     |     |     |     |     |
| GAC | GAG  | CTG | TTT  | GAG | CAG  | GAG | CGC  | AAT | GTG  | CGC | ACA  | GCC | ATG | ACA | AAC | CGC | GCG |
| D   | E    | L   | F    | E   | Q    | E   | R    | N   | V    | R   | T    | A   | M   | T   | N   | R   | A   |
|     | 1899 |     | 1908 |     | 1917 |     | 1926 |     | 1935 |     | 1944 |     |     |     |     |     |     |
| GGA | TTG  | CTG | GCC  | CTG | ATG  | CTG | CAC  | CAG | ACG  | ATC | CAG  | CAC | GAT | CCC | CTC | ACT | ACC |
| G   | L    | L   | A    | L   | M    | L   | H    | Q   | T    | I   | Q    | H   | D   | P   | L   | T   | T   |
|     | 1953 |     | 1962 |     | 1971 |     |      |     |      |     |      |     |     |     |     |     |     |
| GAC | CTG  | CGC | TCC  | AGT | GCC  | GAC | CGC  | TGA | 3'   |     |      |     |     |     |     |     |     |
| D   | L    | R   | S    | S   | A    | D   | R    | *   |      |     |      |     |     |     |     |     |     |

**Figura 3**

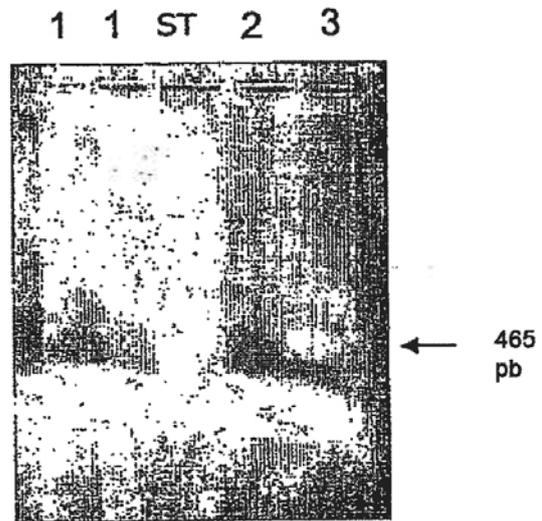
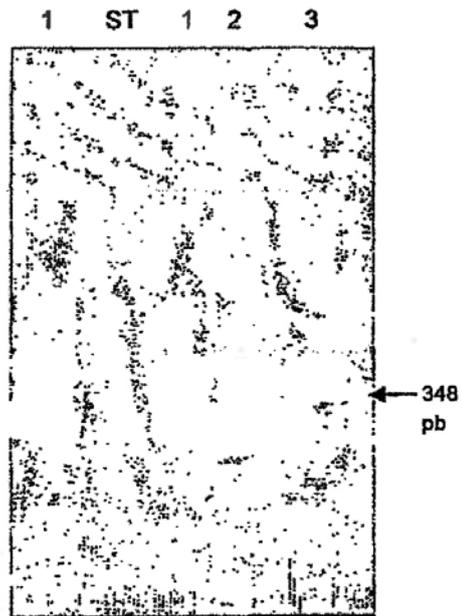


Figura 4



**Figura 5**



**Figura 6**

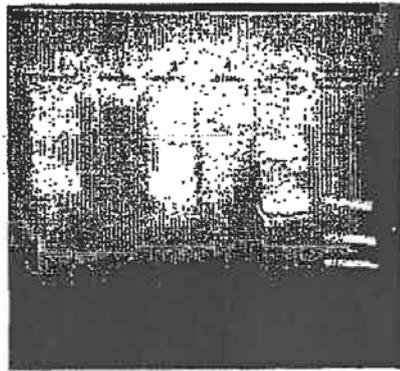
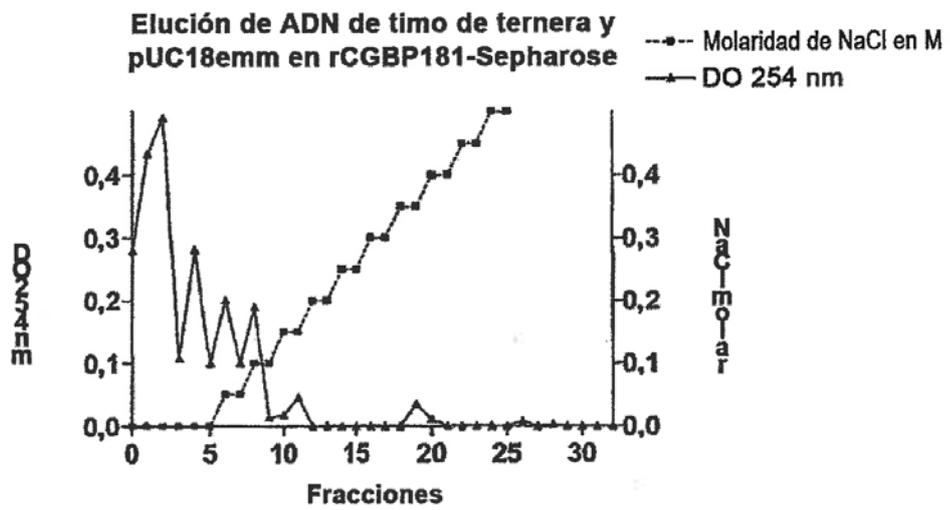


Figura 7

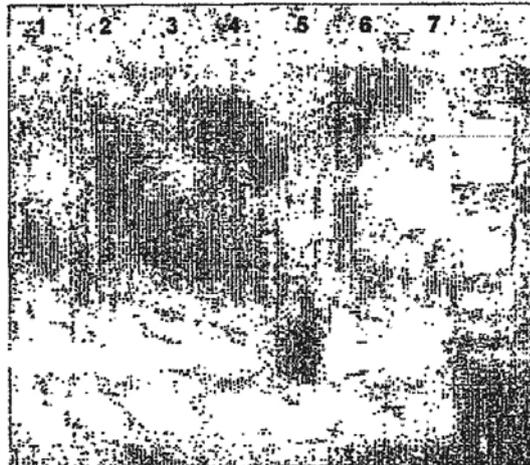


**Figura 8**



**Figura 9**

Resultado de la PCR tras el enriquecimiento de ADN procariota a partir de una mezcla de ADN de *Staphylococcus aureus* y ADN humano usando la proteína CGBP181 acoplada a CNBr-Sepharose



**Leyenda:**

- |                                            |                       |
|--------------------------------------------|-----------------------|
| 1 E <sub>1</sub> (E = fracción de elución) | 6 antes de la columna |
| 2 E <sub>2</sub>                           | 7 control pos.        |
| 3 E <sub>3</sub>                           | 8 marcador pGEM       |
| 4 E <sub>4</sub>                           |                       |
| 5 E <sub>5</sub>                           |                       |

**Figura 10**

**Resultado de la PCR tras el enriquecimiento de ADN procariota a partir de una mezcla de ADN de Staphylococcus aureus y ADN humano usando la proteína CGBP181 acoplada a AH-Sepharose**



**Leyenda:**

- |                                            |                       |
|--------------------------------------------|-----------------------|
| 1 E <sub>1</sub> (E = fracción de elución) | 6 control negativo    |
| 2 E <sub>2</sub>                           | 7 antes de la columna |
| 3 E <sub>3</sub>                           | 8 control positivo    |
| 4 E <sub>4</sub>                           | 9 marcador BIORAD     |
| 5 E <sub>5</sub>                           |                       |