

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 502**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2010 E 10007204 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2012 EP 2407552**

54 Título: **Procedimiento para el aislamiento de las proteínas unidas a cualquier tipo de secuencia de ácido nucleico de interés**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2013

73 Titular/es:
**CNRS (100.0%)
3, rue Michel Ange
75794 Paris Cedex 16, FR**

72 Inventor/es:
**FUCHS, ROBERT y
FUJII, SHINGO**

74 Agente/Representante:
CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 399 502 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 aislamiento de las proteínas unidas a cualquier tipo de secuencia de ácido nucleico de interés.

5 El ADN eucariota está unido y es interpretado por muchos complejos de proteínas en el contexto de la cromatina.

La descripción del grupo completo de proteínas que regulan el *locus* específico es fundamental para entender la expresión y la regulación de los genes.

10 Los metabolismos celulares, como el mantenimiento del genoma, la expresión del gen, la proliferación celular programada, y otros, se archivan (indexan) en la cromatina mediante mecanismos de combinaciones específicas de proteínas altamente reguladas que transportan modificaciones traslacionales y que forman parte de las redes de proteínas.

15 A pesar de los diversos intentos de caracterización, los cromosomas siguen siendo unos orgánulos celulares poco caracterizados (Kornberg and Lorch, 2007).

Entender la forma en la que se codifica y se almacena la historia transcripcional en la cromatina es un gran reto que actualmente resulta limitado por la falta de procedimientos adecuados para aislar fragmentos específicos de cromatina, en adelante denominado cromatina de Interés (Col), y para analizar su contenido proteico en función de las condiciones de crecimiento, el ciclo celular, el tipo celular...

20 El término fragmento de "cromatina de Interés" se refiere al complejo entre una secuencia específica de ácidos nucleicos (es decir, un gen determinado) y todas las proteínas asociadas.

25 El aislamiento de estos fragmentos de nucleoproteínas específicos es una tarea especialmente difícil debido al gran tamaño de los genomas como el caso del genoma humano (3×10^9 bp).

30 Para aislar el fragmento de cromatina asociado a un único gen humano (tamaño medio hipotético de 3 kb), sería necesario aislar 1 fragmento de entre 10^6 fragmentos.

Existe la necesidad de procedimientos que simplifiquen el aislamiento de fragmentos Col.

35 En los últimos 25 años, se han seguido diferentes estrategias para aislar la cromatina para establecer el locus específico de la composición de la proteína.

Zahedi et al., en *Inflammation* 26, 183-191 (2002) dan a conocer el aislamiento de proteínas que se unen a la región del promotor C11NH formadora de tríplex.

40 Déjardin and Kingston (*Cell* 136, 175-186, January 9, 2009) describen un procedimiento basado en la hibridación de Watson-Crick para aislar telómeros que contienen los fragmentos de cromatina.

45 Pero esta técnica sólo se puede utilizar en fragmentos de telómeros que contienen regiones que presentan una sola hebra (extremo saliente 3') que son capaces de hibridar con una sonda de oligonucleótidos complementaria mediante el emparejamiento de las bases de Watson-Crick.

50 Los telómeros son un excepción porque (1) originalmente contienen ADN de cadena sencilla de secuencias conocidas que por consiguiente pueden formar los pares de bases de Watson-Crick con una sonda complementaria, (2) están sobrerrepresentados porque que existen 92 telómeros/célula.

Por consiguiente, la técnica descrita no es universal y no permite el aislamiento del fragmento de nucleoproteína fuera del extremo de los cromosomas, es decir, en una de las partes del cromosoma, más ventajosamente independientemente de la secuencia de ácido nucleico de los fragmentos de interés.

55 Existe la necesidad de un procedimiento que permita el aislamiento de fragmentos de nucleoproteínas de interés, localizados en una parte del cromosoma, ventajosamente los fragmentos de cromatina, más ventajosamente independientemente de la secuencia de ácido nucleico de los fragmentos de interés.

Uno de los objetivos de la presente invención es proponer este procedimiento.

60 La invención sirve para proporcionar una forma novedosa para el aislamiento y la identificación de proteínas unidas a un tipo de secuencia de ADN de interés, (secuencia de Interés: Sol), ventajosamente un tipo de secuencia de ADN de interés, especialmente en el contexto de un ADN o ARN cromosómico o un ADN episomal en células vivas o en tubos de ensayo.

65 En el contexto de la presente invención, las células vivas incluyen todos los organismos que contienen material de

ácido nucleico como por ejemplo, virus, bacterias, células, cuyas proteínas unidas deben analizarse.

La invención se basa en la utilización de una secuencia marcada de ácido nucleico específica, ventajosamente un ADN de doble cadena específico capaz de formar una triple hélice, denominada secuencia formadora de tríplex, (secuencia TFT), que se encuentra localizada próxima a la secuencia Sol.

La invención se ha adaptado para todas las fuentes de ácido nucleico (Sol) en uno de los tipos de células vivas como las definidas anteriormente, ya que unas etiquetas formadoras tríplex cortos (TFT) de una longitud predeterminada, se pueden introducir cerca de dicha secuencia de interés (Sol) y de las proteínas a las que están unidas.

Ventajosamente, la invención se ha adaptado para una de las fuentes de ADN (cromosómico, episomal, vírico...).

Según la invención, la secuencia TFT puede encontrarse en las células como parte de un ADN episomal o integrada próxima a la secuencia estudiada de ácido nucleico de interés.

Según la invención, la secuencia TFT puede formar un complejo estable en forma de una triple hélice con una sonda específica de oligonucleótidos que se denomina Oligonucleótido formador de tríplex (TFO).

Sea cual sea la forma final de la secuencia TFT (episomal o integrada), puede presentarse en forma de una sola secuencia o de secuencias repetidas. Cuando se presenta en forma de secuencias repetidas, las secuencias repetidas se pueden organizar extremo a extremo o extremo a final, contiguas o espaciadas.

Por consiguiente, según la invención, la primera etapa del procedimiento consiste en introducir una secuencia TFT próxima al complejo de proteínas Sol del cual se analizará.

Cuando la TFT se introduce próxima a la Sol, la Sol y sus proteínas asociadas se pueden purificar a partir de una mezcla de complejos de fragmentos de ácido nucleico no relacionados mediante la utilización de la sonda TFO.

Por consiguiente, un primer objeto de la invención se refiere a un nuevo procedimiento para el aislamiento de la unión de proteínas a cualquier secuencia de ácido nucleico de interés (Secuencia de interés: Sol), en el que:

- en una primera etapa, una etiqueta formadora de tríplex (TFT) se introduce en dicha secuencia de ácido nucleico de una célula viva y estas células vivas se dejan crecer;
- en una segunda etapa, las células obtenidas en la etapa 1 se entrecruzan;
- en una tercera etapa, estas células vivas entrecruzadas obtenidas en la etapa 2, se recogen y se mezclan con una sonda molecular específica de la TFT introducida (la sonda TFO) bajo unas condiciones que permitan la formación de tríplex de ácido nucleico;
- en una cuarta etapa, el tríplex de ácido nucleico formado en la tercera etapa se aísla y se analizan las proteínas unidas.

Según la invención, una secuencia de ácido nucleico de interés (Sol) puede ser ADN (ácido desoxirribonucleico) o ARN (ácido ribonucleico), ventajosamente ADN, más ventajosamente ácido nucleico genómico (ADN o ARN), preferentemente ADN genómico o ADN episomal.

Según la primera etapa de la invención, la TFT puede formar parte de un ácido nucleico de doble cadena lineal o circular (la TFT que contiene el ácido nucleico), preferentemente ADN de doble cadena lineal o circular.

En una primera forma de realización de la invención, la TFT que contiene el ácido nucleico se puede mantener en la célula como un episoma. Según esta forma de realización, la TFT que contiene el ácido nucleico será un ácido nucleico circular, preferentemente un plásmido que incluye además la secuencia TFT de origen viral.

En una segunda forma de realización de la invención, la TFT que contiene el ácido nucleico se puede introducir en dicha secuencia de ácido nucleico aleatoriamente o de forma directa, es decir, introduciéndola próxima a una Sol predeterminada. Cuando la TFT que contiene la inserción del ácido nucleico se realiza aleatoriamente será posible analizar las Sol desconocidas. Para esto, la TFT que contiene el ácido nucleico puede ser un tipo de ADN, ventajosamente comprende además una secuencia indicadora utilizada como un marcador para detectar las células que presentan dicho ADN integrado.

Cuando la TFT que contiene la inserción el ácido nucleico se realiza de una forma directa a través de una recombinación homóloga o específica del sitio, será posible analizar una Sol conocida y a proteína que se ha unido a ella. La inserción de la TFT que contiene el ácido nucleico estará en el área de una secuencia conocida del ácido nucleico de interés cuyas secuencias flanqueantes son conocidas lo que permite introducir específicamente la TFT

que contiene el ácido nucleico cerca de la Sol conocida que se debe analizar. En esta forma de realización, la TFT que contiene el ácido nucleico estará preferentemente en forma de plásmido que además de la secuencia TFT incluye las secuencias flanqueantes conocidas lo que permitirá la recombinación de homólogos entre el plásmido y el ácido nucleico de interés. Puede ser ventajoso que este plásmido comprenda además una secuencia que se utilice como marcador para la detección de las células que presenten este ADN integrado.

Según la primera etapa de la invención, el ácido nucleico que contiene las etiquetas formadoras de tríplex (ácido nucleico que contiene la TFT) se puede introducir en dicha célula viva a través de uno de los procedimientos conocidos como el procedimiento con fosfato cálcico (Graham, F. L. and Van Der Eb., A. J., 1973, *Virology* 52: 456-467), el procedimiento DEAE- dextrano (Farber, F., et. al., 1975, *Biochem. Biophys. Acta.*, 390: 298-311; Pagano, J. S., 1970, *Prog. Med. Virol.*, 12:1-48), el procedimiento con poliomitina (Farber, F., et. al., 1975, *Biochem Biophys. Acta.*, 390: 298-311), el procedimiento con microinyección de ADN (Cappechi, M. R., 1980, *Cell*. 22: 479-488), el procedimiento con polietilenglicol (PEG)/dimetilsulfóxido (DMSO) (Jonak, Z. L., et. al., 1984, *Hybridoma* 3: 107-118), el procedimiento con tripsina/EDTA/glicerol (Chu, G. J. and Sharp, P. A., 1981, *Gene* 13: 197-202) el procedimiento con choque osmótico (Okada, G. Y. and Rechsteiner, M., 1982, *Cell* 29: 33-41), el procedimiento con fusión de liposoma (Poste, G., et al., 1976, *Methods. Cell. Biol.*, 14: 33-71; Fraley, R., et. al., 1980, *J. Biol. Chem.* 255: 10431-10435; Wong, T. K., et. al., 1980, *Gene* 10: 87-94), el procedimiento mediado por fantasmas de los eritrocitos (Furusawa, M., et. al., 1976, *Methods. Cell. Biol.*, 14: 73-80; Straus, S. And Raskas, H., 1980, *J. Gen. Virol.* 48: 241-245; Godfrey, W., et. al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2267-2271), el procedimiento de fusión del protoplastos bacterianos (Chu, G. J. and Sharp, P. A., 1981, *Gene* 13: 197-202; Sandri-Goldin, R. M., et. al., 1981, *Mol. Cell. Biol.* 1: 743-752; Oi, V. T. And Morrison, S. L., 1986, *Biotechniques* 4: 214-221), el procedimiento de la envuelta del virus Sendai reconstituido (Loyter, A., at. Al., 1984, *Ciba. Found. Symp.*, 103: 163-180), electroporación con rayo láser (Tsuka Koshi, M. Et. al., 1984, *Appl. Phys. B.*, 35: 2284-2289; Tao, W., et. al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84: 4180-4184), el procedimiento de electroporación (Neumann, E., et. al., 1982: *EMBO. J.*, 1: 841-845; Potter, H., et. al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81: 7161-7165), el procedimiento con microproyectiles de tungsteno (Klein, T. M., et. al., 1987, *Nature*, 327: 70-73), el procedimiento con vector retrovirus (Jaenisch, R., 1976, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73: 1260-1264; Jahner, D. And Jaenisch, R., 1980, *Nature* 287: 456-458).

Según la forma de realización preferida de la invención, es decir, la integración de la TFT que contiene el ácido nucleico en la secuencia del ácido nucleico, la utilización de técnicas como la recombinación homóloga o la recombinación específica del sitio son las preferidas. Estas técnicas son bien conocidas en la técnica. Según la invención, el procedimiento descrito por Sorrell DA and Kolb AF., ("Targeted modification of mammalian genomes" *Biotechnol Adv.* 2005, Nov; 23(7-8): 431-69) es la preferida.

Según la primera etapa de la invención, las células vivas pueden crecer según uno de los procedimientos de cultivo conocidos siempre y cuando el procedimiento sea adecuado para células vivas. Un experto en la materia no tendrá dificultades para encontrar unas buenas condiciones de cultivo adecuadas para las células que se están estudiando.

Según la invención, la secuencia TFT tendrá que ser reconocida por una sonda molecular específica suya y deberá formar un complejo estable en forma de una hélice triple con una sonda molecular específica denominada oligonucleótido formador de tríplex (TFO).

En una forma de realización de la invención, que es la preferida, la secuencia TFT puede ser una secuencia que normalmente no está presente en la secuencia de ácido nucleico en la que la Sol está presente.

Se han realizado diversos estudios sobre la especificidad de la TFT. Según estos estudios, los requisitos estructurales influyen en el diseño de las TFO y han llevado a una clasificación en diferentes subtipos con unas propiedades de unión individuales del final específico de la TFO, es decir que es la sonda molecular específica la que reconoce la TFT.

Los oligonucleótidos formadores de tríplex (TFO) se unen en el surco principal de las secuencias oligo-pirimidina-oligo-purina que permiten que el ADN de doble cadena sea la diana específica.

Es sabido que la mayor parte del tiempo el ADN existe en forma de cadenas dobles antiparalelas que se mantienen unidas a través del esquema de pares de bases de Watson-Crick: A/T, G/C.

Pero también es sabido, que las dobles hélices de ADN que contienen los fragmentos Poli-purina (poli-Pu) en una hebra y (fragmentos Poli-pirimidina (poli-Pi) en la hebra complementaria), son capaces de formar tríplex con ambos oligonucleótidos poli-Pi o poli-Pu mediante el mecanismo de pares de bases de Hoogsteen.

Por consiguiente, en una forma de realización preferida de la invención, la secuencia TFT puede ser una secuencia poli-pirimidina-poli-purina, es decir, una secuencia que puede ser reconocida a través de los pares de bases Hoogsteen por un TFO poli-pirimidina o un TFO poli-purina.

Preferentemente, la secuencia TFT puede ser una secuencia poli-pirimidina-poli-purina que puede ser reconocida a través de pares de bases Hoogsteen por un TFO de polipirimidina.

En una forma de realización preferida, la secuencia TFT puede ser una secuencia poli-pirimidina-poli-purina que normalmente no está presente en la secuencia de ácido nucleico en la que está presente la secuencia Sol.

5 Según la invención, la secuencia TFT puede presentar una longitud comprendida entre 10 a 50 pares de bases, preferentemente entre 15 a 35 pares de bases, y más preferentemente de una longitud de aproximadamente 20 pares de bases.

10 Según la invención, en la segunda etapa las células obtenidas en la etapa 1 se entrecruzan. Esta etapa es importante porque durante el entrecruzamiento las proteínas que se encuentran alrededor del ácido nucleico están entrecruzadas entre ellas y entre ellas y dicho ácido nucleico. Según la invención, se puede utilizar uno de los métodos conocidos en la técnica que permita el entrecruzamiento de la proteína-proteína y/o proteína-ácido nucleico como por ejemplo, para el entrecruzamiento proteína-ADN: entrecruzamiento con luz UV, procedimiento de entrecruzamiento con formaldehído, con cromo hexavalente y para proteína-proteína para un análisis posterior mediante la combinación con el entrecruzamiento proteína-ADN: adipimidato de dimetilo (DMA); suberato de disuccimidilo (D88); ditio-bis[propionato de succimidilo] (D8P); etilenglicol-bis[succinato de succimidilo] (EG8).

15 Preferentemente, la técnica de entrecruzamiento con formaldehído *in vivo* se puede utilizar según el procedimiento descrito por Orlando V. Et. al. (Methods. 1997 Feb; 11 (2): 205-14).

20 Para optimizar el procedimiento y como forma de realización preferida según la invención, es posible añadir una etapa de lisis celular después de la etapa de entrecruzamiento. La etapa de lisis celular se puede realizar según una de las formas conocidas, preferentemente según el procedimiento descrito en las siguientes referencias. ("Association of RNA polymerase with transcribed regions in Escherichia coli", Wade J. T. and Struhl K.; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004 Dec. 21: 101(51): 17777-82 o "Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo", Mol Cell. 2006 Aug: 23(4): 471-82).

25 Según la tercera etapa del procedimiento de la invención, estas células vivas entrecruzadas obtenidas en la etapa 2 se recogen y se mezclan con una sonda molecular específica de la TFT introducida (la sonda TFO) bajo unas condiciones que permitan la formación de tríplex de ácido nucleico.

30 Según la tercera etapa de la invención, las células se pueden recoger según uno de los procedimientos conocidos como, por ejemplo, los procedimientos descritos en "Molecular cloning: a laboratory manual"; (Joseph Sambrook, David William Russell, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001). Preferentemente, las células se recogen mediante raspado y centrifugación.

35 En esta etapa, debido a que las células recogidas normalmente forman una agrupación más o menos compacta, sería beneficioso añadir una etapa de fragmentación antes de añadir la sonda TFO. Para esto se pueden utilizar diversas técnicas mecánicas (procedimientos de cizalladura), enzimáticas o sónicas. Según la invención, los procedimientos de sonicación son los preferidos.

Esta etapa de fragmentación puede mejorar la siguiente etapa de hibridación de la sonda TFO a la secuencia TFT.

40 Esta etapa de fragmentación puede mejorar la siguiente etapa de hibridación de la sonda TFO a la secuencia TFT. Según la tercera etapa de la invención, después de que se hayan recogido, y finalmente entrecruzadas y fragmentadas, las células se deben poner en contacto con la sonda TFO de forma que se facilite el reconocimiento de la secuencia TFT por parte de la TFO. Se puede utilizar un procedimiento que conduzca a la hibridación de la TFO a la secuencia TFT según la etapa 3 del procedimiento de la invención.

45 En una forma de realización preferida de esta tercera etapa de la invención, se puede facilitar el reconocimiento de la secuencia TFT por parte de la TFO purificando o aislando los núcleos celulares antes de la mezcla con la TFO. Por purificar o aislar los núcleos se debe entender que estas células recogidas son sometidas al tratamiento de forma que sus ácidos nucleicos y proteínas que están entrecruzados entre ellos o los núcleos celulares eucariotas están por lo menos parcialmente aislados de su entorno celular. Un experto conoce diversas técnicas para conseguir este resultado. Estas técnicas están ampliamente descritas en la bibliografía de biología y/o biología molecular. Según la invención, las células recogidas primero se pueden lisar y después se pueden purificar y aislar los ácidos nucleicos y las proteínas que están entrecruzadas entre ellas o los núcleos celulares eucariotas. Uno de los procedimientos preferidos para intentar obtener este resultado es el procedimiento descrito en Molecular cloning: a laboratory manual (Sambrook J. and Russell D., Cold Spring Harbor Laboratory Press. U. S.; third edition (December 5, 2000))

50 Se ha descrito que la estabilización de formación de tríplex y la especificidad de reconocimiento elevado de un sitio diana seleccionado (sitio etiqueta formador de tríplex) se puede conseguir mediante las siguientes modificaciones de la sonda TFO:

65 1- Introducción de nucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados (LNA) mezclados con nucleótidos normales: los

ácidos nucleicos bloqueados (LNA) comprenden ribonucleótidos con una unión 2'-O,4'-C-metileno. Se ha descrito recientemente que las TFO que contienen LNA ejercen una estabilización de tríplex muy significativa. Más precisamente, los trabajos previos han demostrado, por consiguiente, que la alternancia de nucleótidos normales y LNA en las secuencias TFO es adecuado para la formación de tríplex. Por consiguiente, según la invención, la TFO puede comprender preferentemente nucleótidos de ácidos nucleicos (LNA) mezclados con nucleótidos normales (Alexei A. et. al., (1998). "LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition". *Tetrahedron* 54 (14): 3607-30; Satoshi Obika et. al. (1998). "Stability and structural features of the duplexes containing nucleoside analogues with a cross-linked N-type conformation, 2'-O,4'-C-methyleneribonucleosides". *Tetrahedron Lett.* 39 (30): 5401-4).

2- Adición de un compuesto químico compuesto por una estructura aromática en anillo que funciona como un intercalador en el extremo 5' de la TFO. Esta estructura aromática en anillo puede ser, por ejemplo, psoraleno, acridina, bromuro de etidio, berberina, proflavina, daunomicina, doxorubicina, talidomida, quinacrina u ortopenantrolina...

3- Sustitución de la citosina por 5-metil citosina.

Por consiguiente, según una forma de realización preferida de la invención, la TFO pueden ser unas secuencias de ácidos nucleicos que comprenden nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA) mezclados con nucleótidos normales.

En otra forma de realización preferida de la invención, la TFO puede comprender en su extremo 5' un compuesto químico compuesto por una estructura aromática en anillo, por ejemplo, un agente intercalador como psoraleno, acridina, bromuro de etidio, berberina, proflavina, daunomicina, doxorubicina, talidomida, quinacrina o ortopenantrolina, preferentemente psoraleno. Preferentemente, este compuesto químico puede ser un compuesto foto activable, más preferentemente un agente de intercalado foto activable. Esto permitirá, una vez se haya intercalado el compuesto químico en el ácido nucleico de la TFT de doble hebra, unir covalentemente este compuesto con el ácido nucleico, utilizando una fuente de emisión de fotones. Esto reforzará la fuerza del complejo TFO/TFT facilitando, de esta forma, la recuperación del complejo proteína/ácido nucleico en la etapa de purificación final.

En otra forma de realización preferida de la invención, en la TFO, las citosinas se pueden sustituir por 5-metil citosina.

En una de las formas de realización más preferidas de la invención, la TFO puede ser una secuencia de ácido nucleico que comprende nucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados (LNA) mezclados con nucleótidos normales, que pueden comprender en su extremo 5' una estructura aromática en anillo, por ejemplo, un agente de intercalado y en el que las citosinas se pueden reemplazar por la 5-metil citosina.

En otra forma de realización de la invención, la sonda TFO puede comprender un extremo de especificidad como se ha descrito anteriormente (nucleótidos LNA y normales, principalmente la sonda, con una estructura de anillo aromático en su extremo 5') seguido en su extremo 3' por un agente de unión conectado a una asa de captura que se puede capturar específicamente por un gancho de captura correspondiente.

Según la invención, este agente de unión puede ser de uno de los espaciadores conocidos, preferentemente un espaciador de carbono que puede presentar una longitud comprendida entre 1 a 300 átomos de carbono, preferentemente entre 100 a 200, más preferentemente entre 110 a 130 átomos de carbono.

Según la invención, el dispositivo de captura (asa de captura/gancho de captura correspondiente) puede ser una de las parejas de moléculas que interactúan fuertemente, como por ejemplo, uno de los materiales que presentan una interacción por afinidad como, la combinación de histidina-metal, antígeno-anticuerpo (por ejemplo, FLAG-anti FLAG), oligonucleótido específico-proteína de unión específica de oligonucleótido (por ejemplo, lacO-LacI), y otros.

En una forma de realización particular, la asa de captura puede ser un compuesto que se puede unir a otro compuesto utilizado como un gancho. Un gancho preferido puede ser la estreptavidina o un equivalente suyo como avidina o neutravidina y un asa de captura preferida puede ser la biotina o un equivalente como la destiobiotina.

Según una forma de realización muy preferida de la invención, la sonda TFO se puede diseñar a partir de su extremo 5' como un agente de intercalado (psoraleno) unido a la secuencia TFO unida a un agente de unión espaciado a una asa de captura.

La figura 1 muestra un ejemplo de esta sonda TFO.

En la tercera etapa del procedimiento de la invención, se debe formar una estructura en tríplex de un nucleótido. Según la invención, se puede utilizar una de las condiciones que permitan esta formación. Según la invención, uno

de los procedimientos preferidos que se pueden utilizar es el descrito en Brunet et. al. (Nuclei Acid Research, 2005, Vol. 33, N°13, 4223-4234).

Según la cuarta etapa del procedimiento de la invención, el tríplex de ácido nucleico que se forma en la tercera etapa se puede aislar según uno de los procedimientos conocidos. Un procedimiento preferido puede ser un procedimiento en el que un gancho, específico del asa de captura, se utiliza para unirse al asa de captura. Estos procedimientos pueden ser, por ejemplo, una combinación de histidina-metal, antígeno-anticuerpo (por ejemplo, FLAG-anti FLAG), oligonucleótido específico-proteína de unión específica del oligonucleótido (por ejemplo, lacO-lacI) con este condicionante.

Según una de las formas de realización preferidas de la invención, cuando el asa de captura es biotina o un equivalente suyo, el gancho puede ser estreptavidina.

Para facilitar la purificación del tríplex capturado, el gancho se puede fijar en una columna o microesferas, por ejemplo microesferas magnéticas. Según la invención, la utilización de microesferas magnéticas es el procedimiento de purificación preferido. Estos procedimientos están descritos en muchas referencias como en Déjardin and Kingston (Cell 136, 175-186, January 9, 2009).

La invención también se refiere a la utilización del procedimiento de la invención para la preparación de un complejo nucleótido-proteína.

Por último, la invención se refiere a un kit para la implementación del procedimiento de la invención, este kit que comprende por lo menos una TFT introducida próxima a la Sol en la secuencia del ácido nucleico de una célula viva, siendo esta TFT como la que se ha descrito anteriormente en la presente memoria, por lo menos un compuesto de entrecruzamiento, por lo menos una sonda molecular específica para la secuencia TFT (la sonda TFO), siendo esta sonda TFO como la que se ha descrito anteriormente en la presente memoria, y un gancho constituido por un compuesto que se puede unir al asa de captura de las TFO.

La presente invención se pondrá más claramente de manifiesto, y sus detalles resultarán más evidentes, a partir de los ejemplos y la descripción en relación a las figuras que se muestran en las ilustraciones adjuntas a continuación, en las que:

Figura 1: muestra un ejemplo de una sonda TFO (TFO-1): el extremo de especificidad está formado por un oligonucleótido 22-mer modificado compuesto por una mezcla de residuos de LNA y ADN en letras minúsculas y mayúsculas respectivamente. La C mayúscula representa residuos de 5-metil citosina; en el extremo 5' del nucleótido se injerta un residuo de psolareno. Su extremo 3' está modificado con un residuo de destiobiotina (el asa de captura) unido a un espaciador compuesto por una cadena lineal de 124 átomos.

Figura 2: muestra la construcción de plásmidos que contienen la secuencia tag formadora de tríplex (TFT): pAS03 deriva de pcDNA3.1(+)-CAT (Invitrogen). pAS03.1 deriva de pAS03 mediante la inserción de la secuencia TFT-1. pAS03.2 deriva de pAS03.1 mediante la inserción de una secuencia TFT-1 adicional. pAS04 deriva de pAS03.2 mediante la inserción de una tercera secuencia TFT-1. La secuencia TFT-1 en rojo forma un tríplex con la sonda TFO-1 a través de la unión Hoogsteen. pUC ori: origen de número de copia elevado en E. coli. SV40 ori: origen de replicación en células de primates que expresan el antígeno T grande del SV40. Ap: gen de resistencia a la ampicilina. Neo: gen de resistencia a la neomicina. CAT: gen de resistencia al cloranfenicol, PCMV: promotor/potenciador mediador inmediato del citomegalovirus humano.

Figura 3: muestra los resultados obtenidos en el Ejemplo 3 para el aislamiento del plásmido a través de la TFO-1 *in vitro*. Para cada plásmido (pAS03, pAS03.1, pAS03.2, pAS04) se mezclaron 600 ng (\approx 140 fmol) con 8 pmol de TFO-1 (0,4 μ M final) y se agitaron durante 24 horas. Se añadieron a la mezcla 150 μ g de C1 y se agitó durante 18 horas. La mezcla se colocó en una plataforma magnética y se recogió la fracción unida a C1. La C1 recogida se lavó dos veces y el plásmido capturado en la C1 se liberó mediante ebullición.

Las muestras recuperadas se analizaron mediante electroforesis con gel de agarosa. La estimación de recuperación del plásmido en comparación con la introducción fue de: pAS03, <1%; pAS03.1, 53%; pAS03.2, 60%; pAS04, 67%. Los plásmidos utilizados en el presente experimento se amplificaron y se purificaron a partir de *E. coli*. CC: circular cerrado. OC: circular abierto. Dímero: plásmido dimerizado.

Figura 4: muestra el aislamiento del plásmido a través de la TFO-1 bajo diferentes condiciones del tampón *in vitro*. Cada 400 ng (\approx 93 fmol) de los plásmidos (pAS03, pAS04) se mezclaron con 8 pmol de TFO-1 (0,4 μ M final) y se agitaron durante 11 horas. Se añadieron 150 μ g de C1 a la mezcla y se agitó durante 2 horas. La mezcla se colocó en una plataforma magnética y se extrajo el sobrenadante (este sobrenadante se denomina fracción no unida).

La fracción de C1 recogida se lavó dos veces y el plásmido capturado en la C1 se liberó mediante ebullición. Las muestras recuperadas se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Si el plásmido se recupera minuciosamente, las fracciones no unidas (UB, carriles 2-5, 12-15) y plásmido eluido de la C1 (elución por calor,

carriles 6-9, 16-19) se cargan con 15 ng y 20 ng equivalentes de plásmidos, respectivamente.

Los carriles (1, 11) y los carriles (10, 20) se cargan con 15 ng y 5 ng de pAS04 como control, respectivamente. El tampón A está compuesto por Tris-HCl 1,25 mM (7,6), NaCl 150 mM, NP-40 al 0,5%, deoxicolato de sodio al 0,5%, SDS al 0,05%, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,5 mM, 0 sarcosil, 1% y con/sin MgCl₂ 10 mM. El tampón B está compuesto por Tris-HCl 25 mM (7,6), NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, deoxicolato de sodio al 1%, SDS al 0,1%, EDTA al 0,1 mM, EGTA al 0,5 mM, sarcosil al 0,1%, y con/sin MgCl₂ 10 mM.

Figura 5: muestra el aislamiento del plásmido y las proteínas unidas a los plásmidos recuperados a partir de la *E. coli*. Las cepas DH1/pAS03 o DH1/pAS04 crecen hasta una DO₆₀₀ = 0,4. Las células se entrecruzan mediante el tratamiento con formaldehído (3% final) durante 30 minutos, se interrumpe el tratamiento y se trata con ARNasaA. La fracción soluble (sup-1) se separa de la fracción insoluble por centrifugación. La fracción insoluble se resuspende y se somete a sonicación para solubilizar más el material (sup-2). La fracción soluble combinada sup-1 más sup-2 se mezcla con C1 para eliminar las proteínas que se pueden unir a las microesferas C1 independientemente de la presencia de TFO-1. El sobrenadante recuperado se utiliza como la parte introducida para la aproximación de TFO. Una alícuota de la muestra (7x10⁷ células equivalentes de 1,75 ml de cultivo a una DO₆₀₀= 0,4) se mezclan con 12,5 pmol de TFO-1 (0,25 μM) y se agita durante 18 horas. Se añaden 200 μg de C1 a la mezcla y se agitan durante 2 horas. La mezcla se coloca en una plataforma magnética y se elimina el sobrenadante (este sup se denomina fracción no unida (UB)). La C1 recogida se lava 6 veces y el plásmido capturado en la C1 se liberó mediante la adición de un tampón que contiene biotina 10 mM (esta muestra eluida se denomina fracción de elución (E)).

- A) las muestras recuperadas (UB y E) se entrecruzan de forma inversa (RCL) por calentamiento o sin calentamiento, y el 3,3% (UB) y el 10% (E) de las muestras se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa.
- B) 0,1 % (UB) y el 20% (E) de las muestras se entrecruzan de forma inversa y se analizan mediante tinción con plata seguida de SDS-PAGE.

Figura 6: muestra el aislamiento del plásmido recuperado de las líneas celulares humanas. El sup se mezcla con las microesferas conjugadas con estreptavidina para eliminar las proteínas biotinadas intrínsecamente presentes en las células humanas.

El sobrenadante recuperado (S) se utiliza como parte introducida para la aproximación de TFO. Las alícuotas de S que contienen ≈3 g del ADN total (plásmido de ADN ≈ 4,5 ng) se mezclan con 2,5 pmol de TFO-1 (0,25 μM final) y se agitan durante 16 horas. Se añaden 40 μg de C1 a la mezcla y se agita durante 16 horas. La C1 recogida se lava 7 veces y el plásmido capturado en la C1 se liberó mediante la adición de un tampón que contiene biotina 10 mM (esta muestra eluida se denomina fracción de elución (E)). Antes del análisis por PCR, se trataron todas las muestras para el entrecruzamiento inverso mediante calor y desproteización.

- A) Se analizaron 500 ng de ADN del sup mediante electroforesis en gel de agarosa. Se pudo distinguir una banda débil que corresponde al tamaño de un plásmido de ADN lineal o circular abierto.
- B) Se utiliza 1 ng de ADN de S derivado de pAS03 o pAS04 como moldes para la amplificación por PCR que utiliza unos cebadores que comprenden el sitio TFT-1, los fragmentos amplificados, 670 y 731 pb para pAS03 y pAS04 respectivamente, se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.
- C) Se utiliza 1% de las muestras recuperadas después de la elución de las microesferas (E) como moldes para la PCR y se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa.

Ejemplo 1: Construcción de la sonda de oligonucleótido formador de triplex (sonda TFO):

Según la invención y como se muestra en la Figura 1, la construcción final de la sonda TFO-1 presenta las características siguientes:

- 1- Residuo de psolareno unido al extremo 5' del oligonucleótido a través de un espaciador de seis carbonos;
- 2- Oligonucleótido de la secuencia 22-mer específica en la que 11 residuos se sustituyen por LNA (letras minúsculas) y todos los residuos de citosina que incluyen análogos de la citosina-LNA se sustituyen por 5-metil citosina.
- 3- La destiobiotina (análogo de la biotina) en lugar de la biotina, se conjuga en el extremo 3' del oligonucleótido a través de un espaciador de 124 átomos.

El uso de la destiobiotina en lugar de la biotina se justifica por su débil afinidad a la estreptavidina, permitiendo interacciones de destiobiotina-estreptavidina que se pueden desplazar mediante la adición de biotina libre.

Ejemplo 2: construcción del plásmido de ADN que contiene etiquetas formadoras de tríplex (TFT):

El plásmido, pAS03 (6290 bp), se obtiene del pcDNA3.1(+)-CAT (6217 bp, Invitrogen) mediante la modificación de varios sitios de reconocimiento de la endonucleasa de restricción.

De una a tres secuencias de TFT-1, que forman tríplex con la TFO-1 como se ha descrito en el ejemplo 1, se introducen en el pAS03. Los plásmidos resultantes se nombran pAS03.1 (una secuencia TFT-1), pAS03.2 (dos secuencias TFT-1) y pAS04 (tres secuencias TFT-1, 6473 bp) (Figura 2).

Todos estos plásmidos recién construidos retienen orígenes de ColE1 y SV40, se pueden amplificar en *E. coli* y cultivarse en células de primates que expresan el antígeno T largo del SV40.

La figura 2 es un mapa de los plásmidos construidos.

Ejemplo 3: captura *in vitro* de plásmido mediado por TFO

Para verificar que la sonda TFO-1 reconoce eficazmente las secuencias TFT-1 en el plásmido de ADN, los plásmidos preparados en el Ejemplo 2 se mezclan con la sonda TFO-1 y se agitan.

Se añaden microesferas magnéticas (C1) Dynabeads MyOne Streptavidin C1 (Invitrogen) a la mezcla y se agitan nuevamente.

Después, la mezcla se expone a una plataforma magnética para separar la fracción de unión C1 de la fracción no unida. Después del lavado de la muestra de la fracción de C1 para extraer la unión no específica del plásmido de ADN, las microesferas de C1 se eluyen mediante calor o mediante adición de biotina libre.

Los productos eluidos se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa.

Como se muestra en la Figura 3, los plásmidos se recuperan dependiendo de la presencia de la secuencia TFT-1. Los resultados muestran claramente la elevada especificidad y estabilidad del complejo entre los sitios de TFO-1 y TFT-1. Basándose en la titulación (cantidades de TFO-1, C1 y plásmido) y experimentos en el transcurso del tiempo (tiempo de agitación del plásmido con TFO-1, plásmido/TFO-1 con C1, y elución para el plásmido/TFO-1 de la C1), se pueden sacar las conclusiones siguientes:

1. Una proporción molecular de aproximadamente 10:1 de TFO-1 a plásmido (por ejemplo, pAS04) es óptima para conseguir una recuperación eficaz del plásmido. Esta proporción es eficaz en un intervalo amplio de concentración de TFO-1 (por ejemplo, aproximadamente 40 nM ~ 1000 nM);
2. Captura no específica de pAS03 (secuencia no TFT-1) mediante la TFO-1 es inferior al 0,2% de la introducción;
3. 20 µg de microesferas de C1 capturan aproximadamente 94 ng de pAS04 a través de la TFO-1;
4. Aproximadamente 1 pmol de TFO-1 es la cantidad ideal cuando se utilizan 20 µg de C1;
5. El tiempo de incubación entre el plásmido y la TFO-1: 2 ≈ 3 horas (hr) a temperatura ambiente (TA) es suficiente mientras que un tiempo de incubación más largo (por ejemplo, superior a 12 hr) es ligeramente mejor;
6. El tiempo de incubación entre el plásmido con TFO-1 y las microesferas de C1: 1,5 – 2 hr a TA es suficiente mientras que un tiempo de incubación más largo (por ejemplo, superior a 12 hr) es ligeramente mejor;
7. La elución casi máxima del complejo TFO-1-plásmido a partir de las microesferas de C1 se consigue mediante la adición de la biotina libre, durante 3 hr a TA.

Ejemplo 4: componentes del tampón:

Para el aislamiento de las proteínas que utiliza el procedimiento presente, el tampón requiere la presencia de detergentes suaves para disolver los complejos entrecruzados ADN-proteína.

El aislamiento *in vitro* del plásmido mediado por la TFO, como se describe en el Ejemplo 3, se ensayó bajo diferentes condiciones de tampón que incluyen detergentes y se halló que el rendimiento de recuperación del plásmido disminuyó al aplicar fuerzas iónicas bajas. Estos efectos se pueden contrarrestar mediante la adición de MgCl₂ (Figura 4).

En resumen, la aproximación de la captura de TFO-plásmido es funcional en tampones incluyendo detergentes, y la adición de $MgCl_2$ mejora la proporción de la señal en relación al ruido de fondo.

Ejemplo 5: aislamiento de plásmidos y complejos plásmido-proteína a partir de *Escherichia coli*:

Para comprobar la viabilidad del procedimiento TFO, es decir, su capacidad de aislar las proteínas unidas a una secuencia de ADN específica que contiene una secuencia TFT en un organismo vivo, primero se implementaron experimentos que implicaban cepas de *E. coli*.

La cepa DH1 de *Escherichia coli* se transforma con pAS03 o con pAS04 y las cepas transformadas se utilizan como cepas modelo.

Las células de las cepas DH1/pAS03 y DH1/pAS04 se dejan crecer hasta $DO_{600} = 4,4$ en líquido y se entrecruzan mediante un tratamiento con formaldehído (3% final) durante 30 minutos (min) a TA.

Las células entrecruzadas se interrumpen y se someten a tratamiento con ARNasa para digerir la fracción de ARN.

La fracción soluble (sup-1) se separa de la fracción insoluble mediante centrifugación.

La fracción insoluble se resuspende en un tampón y se somete a sonicación para recuperar una fracción adicional del material soluble (sup-2).

La mezcla sup-1 más sup-2 se utiliza como material para el aislamiento de los complejos plásmido-proteína mediante el enfoque TFO.

Como se muestra en la Figura 5A, el pAS04 se aísla específicamente. Aunque una cantidad significativa de plásmido se observa en la fracción que no se unió a las microesferas de C1 (fracción no unida UB), el plásmido no unido se puede recuperar mediante un segundo ciclo de captura de TFO.

En comparación con la reacción *in vitro* en la que 20 μg de C1 presentaba la capacidad de captura de aproximadamente 94 ng de pAS04, el presente experimento que implica un extracto crudo de *E. coli*, 20 μg de C1 capturó sólo aproximadamente 10 ng de pAS04.

Cuando se considere necesario, el rendimiento de recuperación se puede compensar mediante un aumento correspondiente de la cantidad de microesferas de C1.

Como se muestra en la Figura 5B, la cantidad de proteínas recuperadas del DH1/pAS04 es significativamente superior en comparación con DH1/pAS03. Estos resultados muestran que las proteínas asociadas al plásmido *in vivo* se pueden recuperar significativamente a partir de extractos de *E. coli* crudo mediante el enfoque TFO presente.

Ejemplo 6: aislamiento de plásmidos a partir de células humanas:

Como siguiente etapa, el procedimiento TFO se ha adaptado a la captura del plásmido de ADN en células humanas.

La línea celular humana, 293FT (Invitrogen), se transforma de forma transitoria con pAS03 o pAS04 y las células transfectadas se utilizan como cepas modelo para investigar la viabilidad del enfoque TFO en células humanas.

Las células se entrecruzan mediante tratamiento con formaldehído (3% final) durante 30 minutos a TA. Los núcleos se aíslan a partir de las células entrecruzadas y se someten a un tratamiento con ARNasa para digerir la fracción ARN. Los núcleos se interrumpen mediante sonicación y la fracción soluble (sup) se separa de la fracción insoluble mediante centrifugación.

El tamaño medio del fragmento de ADN cromosómico en sup es de aproximadamente 3 – 4 kbp (Figura 6A), un tamaño próximo al tamaño del plásmido original ($\approx 6,5$ kbp). En efecto, el plásmido de longitud completa, en su forma lineal o circular abierta (OC), apenas se puede distinguir en la mancha del ADN en el gel de agarosa (Figura 6A) cuando se analizan 500 ng de ADN del sup. Se debería destacar que la calidad de la preparación sup es crucial.

La sup se mezcla con microesferas conjugadas con estreptavidina para extraer las proteínas que contienen biotina presentes en las células humanas. El sobrenadante (S) se utiliza como material para el aislamiento de los complejos plásmido/proteína mediante el enfoque TFO. Para cuantificar la cantidad de plásmido de ADN en S, se implementa la amplificación del fragmento de plásmido de ADN mediante PCR.

Como se muestra en la Figura 6B, ambos plásmidos de ADN, pAS03 y pAS04, se amplifican similarmente y se estima que representan $\approx 0,15\%$ del ADN total en S. Una cantidad inicial de S que contiene $\approx 3 \mu g$ del ADN total (es decir, una cantidad estimada de plásmido de ADN: $\approx 4,5$ ng) se mezcla primero con 2,5 pmol de TFO-1, y después con 40 μg de C1. Después se añade un exceso de ADN de una sola hebra (concentración final de 10 μM de

5 oligonucleótido 19-mer) para evitar la unión no específica de ADN y complejos ADN/proteína en la superficie de la C1 (proceso de inactivación de microesferas). Después de lavar las microesferas de C1, el plásmido de ADN capturado en las microesferas de C1 se libera y se analiza mediante PCR. Como se muestra en la Figura 6C, el pAS04 se aísla especialmente a partir de extractos humanos crudos mediante el enfoque presente. En efecto, cuando se omite la adición de la TFO-1, el nivel de amplificación de pAS04 es comparable con pAS03 como control negativo (Figura 6C). La señal estimada de la proporción de ruido de fondo es >20 veces (Figura 6C).

10 Se debería destacar que en el presente experimento, el ruido (es decir, la señal PCR generada por pAS03) se genera mediante el ADN que representa el 0,15% del ADN total. Esta cantidad es elevada en comparación con la situación que implica una sola copia de ADN cromosómico fragmentado.

15 En los experimentos de ColFI, la diferencia entre el ruido de fondo será, por lo tanto, más grande. Los datos muestran que la cantidad de ruido está provocada por la unión no específica de los complejos ADN/proteína unidos fuertemente a la superficie de las microesferas magnéticas (experimentos de TFO en la Figura 6C). En comparación con la reacción *in vitro* en la que 20 µg de C1 tienen la capacidad de capturar aproximadamente 94 ng de pAS04, en el presente extracto crudo de células humanas, 20 µg de C1 capturan únicamente aproximadamente 0,1 ng de pAS04.

20 Los resultados actuales muestran que el enfoque TFO es altamente específico para capturar dianas TFT-1 que contienen ADN incluso en presencia de una elevada cantidad de masa de ADN que no es diana. El rendimiento de recuperación reducido (≈ 2%) se puede compensar mediante un aumento correspondiente de la cantidad de microesferas de C1.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para el aislamiento de las proteínas unidas a cualquiera de los tipos de secuencia de ácido nucleico de interés (secuencia de interés: Sol), en el que:
- en una primera etapa, una secuencia etiqueta formadora de tríplex (secuencia TFT) se introduce en dicha secuencia de ácido nucleico de una célula viva y dichas células vivas se hacen crecer;
 - 10 - en una segunda etapa, las células obtenidas en la etapa 1 se entrecruzan;
 - en una tercera etapa dichas células vivas entrecruzadas obtenidas en la etapa 2 se recogen y se mezclan con una sonda molecular específica de la secuencia TFT introducida (la sonda TFO) bajo unas condiciones que permiten la formación de tríplex de ácido nucleico;
 - 15 - en una cuarta etapa, el tríplex de ácido nucleico formado en la tercera etapa se aísla y se analizan las proteínas unidas.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de ácido nucleico de interés es ácido nucleico genómico, preferentemente ADN genómico o ADN episomal.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en la que dicha secuencia TFT es una secuencia que normalmente no está presente en la secuencia de ácido nucleico en la que la Sol está presente.
- 25 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha secuencia TFT es una secuencia polipirimidina-polipurina.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha secuencia TFT es una secuencia etiqueta corta formadora de tríplex (secuencia TFT) que presenta una longitud comprendida entre 10 y 50 pares de bases, preferentemente entre 15 y 35 pares de bases, y más preferentemente de aproximadamente 20 pares de bases de longitud.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las células se entrecruzan utilizando cualquier procedimiento conocido en la técnica que permite el entrecruzamiento proteína-proteína y/o proteína/ácido nucleico, seleccionado de entre entrecruzamiento con luz UV, procedimiento de entrecruzamiento con formaldehído, cromo hexavalente, adipimidato de dimetilo (DMA); suberato de disuccinimidilo (D88); ditiobis[propiionato de succinimidilo] (D8P); etilenglicolbis[succinato de succinimidilo] (EG8), utilizando preferentemente el procedimiento de entrecruzamiento *in vivo* con formaldehído.
- 35 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se realiza una etapa adicional de purificación o aislamiento de los núcleos celulares antes de la adición de TFO.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que se realiza una etapa adicional de fragmentación celular antes de la etapa de purificación o aislamiento de los núcleos celulares.
- 45 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la etapa de fragmentación es mecánica, enzimática o a través de sonicación.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha sonda TFO es una secuencia de ácido nucleico, complementaria a la TFT insertada, sola o combinada con otros elementos que aumentan su eficacia.
- 50 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha TFO es una secuencia de ácidos nucleicos que comprende nucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados (LNA) mezclados con nucleótidos de ADN normal.
- 55 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dichas citosinas de TFO se reemplazan con 5-metil citosina.
- 60 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicha TFO comprende en su extremo 5' un compuesto químico compuesto por cualquier estructura aromática en anillo que funciona como un intercalador, preferentemente un agente de intercalación foto activable como psolareno, acridina, bromuro de etidio, berberina, proflavina, daunomicina, doxorubicina, talidomida, quinacrina u ortofenantrolina.
- 65 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicha TFO es una secuencia de ácido nucleico que comprende nucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados (LNA) mezclados con nucleótidos normales,

que comprende en su extremo 5' un compuesto químico compuesto por una estructura aromática en anillo, preferentemente un agente de intercalado, y en el que las citosinas se reemplazan por 5-metil citosina.

5 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que en dicha sonda TFO, la sonda con una estructura aromática en anillo en su extremo 5' es seguida en su extremo 3' por un agente de unión conectado a un asa de captura que se puede capturar específicamente por un gancho de captura correspondiente.

10 16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que dicho agente de unión es un espaciador de carbono que puede presentar una longitud comprendida entre 1 y 300 átomos de carbono, preferentemente entre 100 y 200, más preferentemente entre 110 y 130 átomos de carbono.

15 17. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que el asa de captura y el gancho de captura correspondiente es cualquier par de moléculas que interactúan fuertemente, como cualquier tipo de materiales que presentan una interacción de afinidad como, la combinación histidina-metal, antígeno-anticuerpo (por ejemplo, FLAG-anti FLAG), oligonucleótido específico-proteína de unión de oligonucleótido específico (por ejemplo, lacO-Lacl).

18. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que dicho gancho de captura correspondiente es estreptavidina o avidina o neutravidina y el asa de captura preferida es la biotina o un equivalente, tal como destiobiotina.

20 19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que dicho gancho se fija sobre una columna o sobre unas microesferas, preferentemente microesferas magnéticas.

25 20. Utilización del procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 para la preparación de un complejo nucleótido-proteína.

30 21. Kit para la implementación del procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, comprendiendo dicho kit (1) por lo menos una secuencia TFT que se debe introducir próxima a la Sol en la secuencia del ácido nucleico de una célula viva, (2) por lo menos un compuesto entrecruzado, (3) por lo menos una sonda molecular (sonda TFO) específica de la secuencia TFT y que puede formar un triplex de ácido nucleico con la secuencia TFT y que contiene un asa de captura, y (4) un gancho constituido por un compuesto que se puede unir al asa de captura de la TFO, siendo dicha TFT, dicho compuesto de entrecruzamiento, dicha sonda molecular específica de la secuencia TFT y dicho gancho como se describen en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

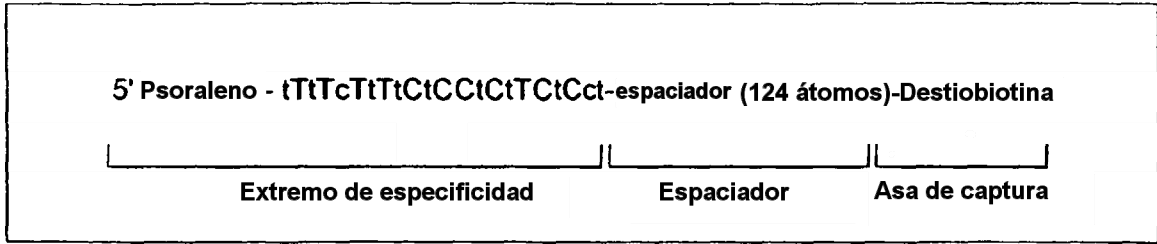


Figura 1

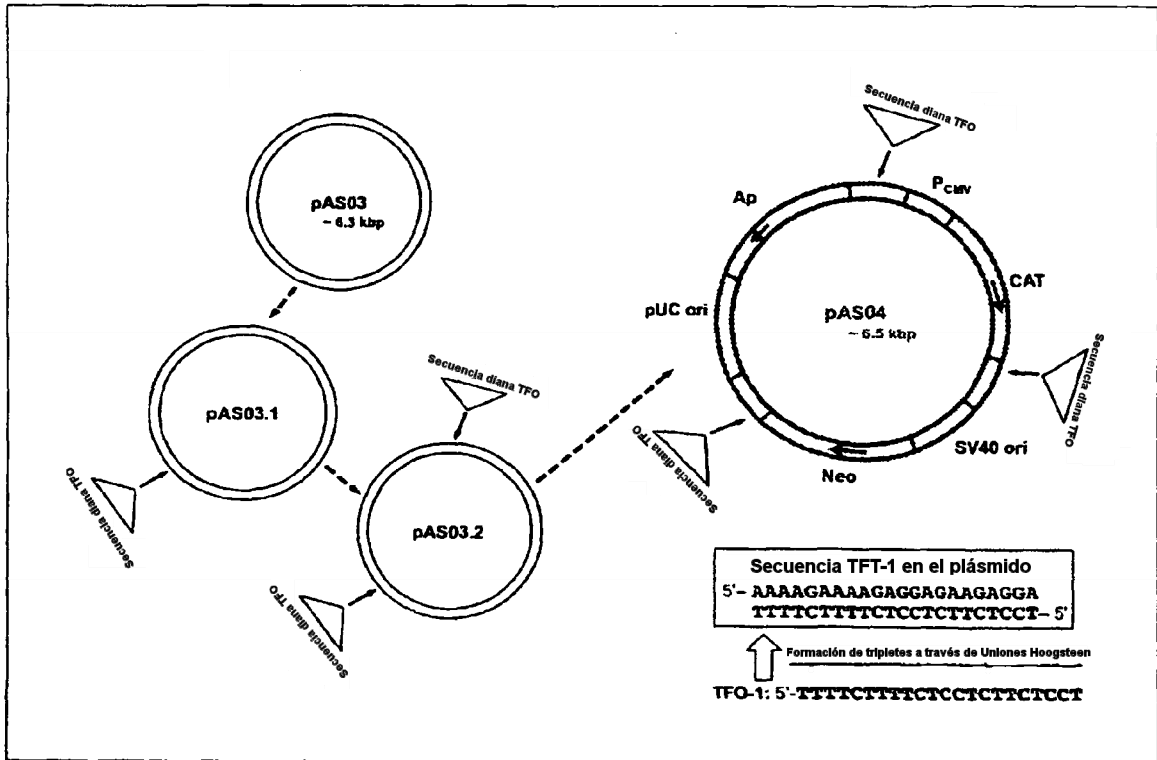


Figura 2

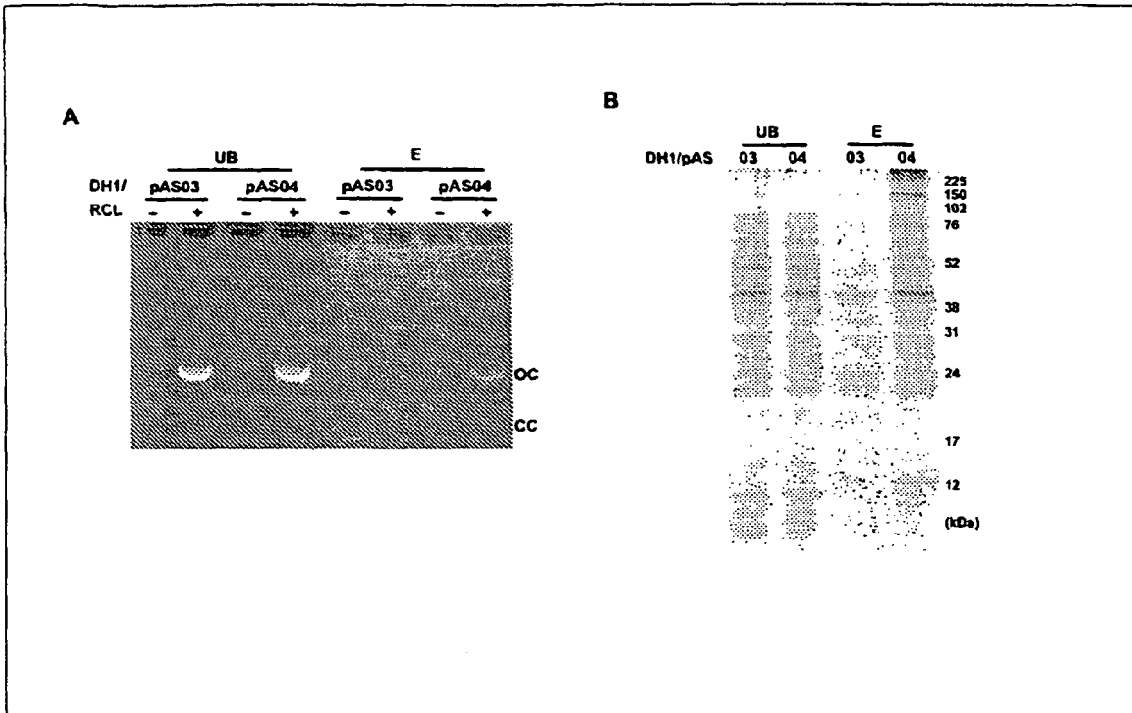


Figura 5

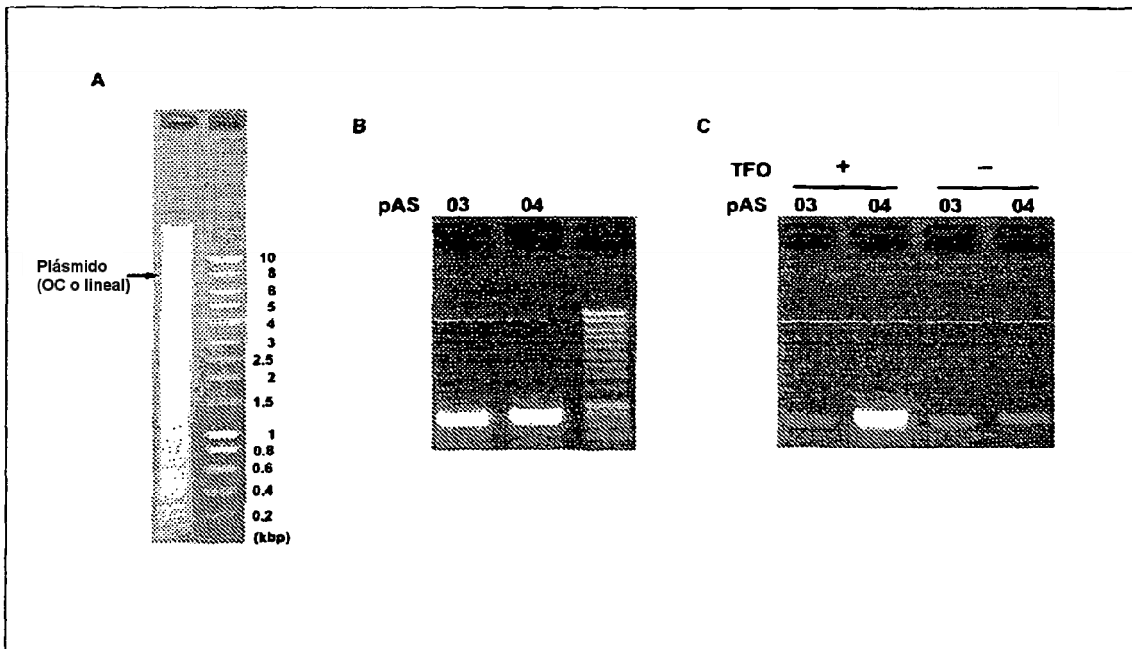


Figura 6