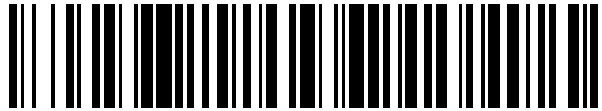


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 983**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.1995 E 02012081 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 1281774**

54 Título: **Soporte para la purificación de un ADN de doble hebra**

30 Prioridad:

16.12.1994 FR 9415162

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

11.03.2014

73 Titular/es:

**AVENTIS PHARMA S.A. (100.0%)
20, AVENUE RAYMOND ARON
92160 ANTONY, FR**

72 Inventor/es:

**COUZET, JOEL;
SCHERMAN, DANIEL y
WILS, PIERRE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 446 983 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).

DESCRIPCION

Soporte para la purificación de un ADN de doble hebra

La presente invención se refiere a un soporte para la purificación de ADN, tal como se describe en la reivindicación 1.

5 Las técnicas de terapia génica y celular conocen actualmente un desarrollo extraordinario. sin embargo, estas técnicas implican la posibilidad de producir cantidades importantes de ADN de pureza farmacéutica. En efecto, en estas nuevas terapias, el medicamento está a menudo constituido por el propio ADN, y es esencial poderlo fabricar, en cantidades adaptadas, aislarlo y purificarlo de manera apropiada a un uso terapéutico en el hombre.

10 Se describe un nuevo procedimiento simple y particularmente eficaz para la purificación de ADN. Permite particularmente obtener purezas particularmente elevadas, con rendimientos elevados.

El procedimiento se basa esencialmente en una interacción específica entre una secuencia insertada sobre el ADN que se va a purificar y un oligonucleótido compuesto de bases naturales o modificadas.

15 Se ha mostrado recientemente que algunos oligonucleótidos son capaces de interactuar específicamente en el gran surco de la doble hélice de ADN para formar localmente triples-hélices, que conducen a una inhibición de la transcripción de genes-diana (Hélène et Toulmé, Biochim. Biophys. Acta 1049 (1990) 99). Estos oligonucleótidos reconocen selectivamente la doble hélice de ADN al nivel de las secuencias de oligopurina-oligopirimidina, es decir, al nivel de regiones que poseen una secuencia oligopúrica sobre una hebra y una secuencia oligopirimídica sobre la hebra complementaria y forman allí localmente una triple hélice. Las bases de la tercera hebra (el oligonucleótido) forman enlaces de hidrógeno (enlaces Hoogsteen o Hoogsteen inverso) con las purinas de los pares de bases Watson-Crick.

20 En la técnica anterior se ha descrito una utilización de este tipo de interacción para aislar un plásmido. Así, Ito et al. (PNAS 89 (1992) 495) describen la utilización de oligonucleótidos biotinilados capaces de reconocer una secuencia determinada de un plásmido y de formar con ésta una triple hélice. Los complejos así formados se ponen en contacto a continuación con bolas magnéticas revestidas de estreptavidina. La interacción entre la biotina y la estreptavidina permite entonces aislar el plásmido por separación magnética de las bolas y a continuación elución. Sin embargo, este procedimiento presenta algunos inconvenientes. En particular, son necesarias dos interacciones específicas sucesivas, la primera entre el oligonucleótido y el plásmido, la segunda entre el complejo biotinilado y las bolas de estreptavidina. Además, la disolución final puede estar contaminada por el oligonucleótido biotinilado, que no se puede utilizar en una composición farmacéutica.

25 Se describe un procedimiento mejorado de purificación de ADN que recurre a este tipo de interacción. Más particularmente, el procedimiento utiliza oligonucleótidos acoplados de manera covalente a un soporte. Este procedimiento es particularmente rápido y conduce a rendimientos y a grados de pureza particularmente elevados. Además, permite purificar el ADN a partir de mezclas complejas que comprenden particularmente otros ácidos nucleicos, proteínas, endotoxinas (tales como lipopolisacáridos), nucleasas, etc.... Los soportes utilizados pueden además reciclarse fácilmente, y los ADN obtenidos presentan propiedades de seguridad farmacéutica mejoradas. Por último, este procedimiento implica una sola etapa contrariamente a la técnica anterior.

30 Bien un procedimiento para la purificación del ADN de doble-hebra, según el cual se hace pasar una disolución que contiene dicho ADN mezclado con otros componentes sobre un soporte en el que está acoplado de manera covalente un oligonucleótido capaz de formar por hibridación una triple hélice con una secuencia específica presente sobre dicho ADN. La secuencia específica puede ser una secuencia presente naturalmente sobre el ADN de doble-hebra, o una secuencia sintética introducida artificialmente en éste.

Los oligonucleótidos utilizados en la presente descripción son oligonucleótidos que hibridan directamente con el ADN de doble-hebra. Estos oligonucleótidos pueden contener las siguientes bases:

45 • timidina (T), que es capaz de formar tripletes con los dobletes A.T del ADN de doble-hebra (Rajagopal et al, Biochem 28 (1989) 7859);

• adenina (A), que es capaz de formar tripletes con los dobletes A.T del ADN de doble-hebra;

• guanina (G), que es capaz de formar tripletes con los dobletes G.C del ADN de doble-hebra;

• citosina protonada (C+), que es capaz de formar tripletes con los dobletes G.C del ADN de doble hebra (Rajagopal et al citado anteriormente);

50 • uracilo (U) que es capaz de formar tripletes con los pares de bases A.U o A.T.

Preferentemente, el oligonucleótido utilizado comprende una secuencia homopirimídica rica en citosinas y la secuencia específica presente sobre el ADN es una secuencia homopúrica-homopirimídica. La presencia de

citocinas permite tener una triple hélice estable a pH ácido, donde las citosinas se protonan, y desestabilizada a pH alcalino, donde las citosinas se neutralizan.

5 Para permitir la formación de una triple-hélice por hibridación, es importante que el oligonucleótido y la secuencia específica presente sobre el ADN sean complementarias. A este respecto, para obtener los mejores rendimientos y la mejor selectividad, en el procedimiento de la invención se utiliza un oligonucleótido y una secuencia específica perfectamente complementarias. Se puede tratar en particular de un oligonucleótido poli-CTT y de una secuencia específica poli-GAA. Como ejemplo, se puede citar el oligonucleótido de secuencia 5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (GAGG(CTT)₇; (SEQ ID n°1), en el que las bases GAGG no forman triple hélice sino que permiten espaciar el oligonucleótido del brazo de acoplamiento; se puede igualmente citar la secuencia (CTT)₇ (SEQ ID n°26). Estos oligonucleótidos son capaces de formar una triple-hélice con una secuencia específica que consta de restos complementarios (GAA). Se puede tratar en particular de una región que consta de 7, 14 o 17 restos GAA, como se describe en los ejemplos.

Otra secuencia de interés específica es la secuencia :

5'-AAGGGAGGGAGGAGAGGAA-3'(SEQ ID n°5).

15 Esta secuencia forma una triple hélice con los oligonucleótidos

5'-AAGGAGAGGAGGGAGGGAA-3'(SEQ ID n°6) o

5'-TTGGTGTGGTGGGTGGGTT-3'(SEQ ID n°7).

20 En este caso, el oligonucleótido se fija en una orientación antiparalela a la hebra polipúrica. Estas triples hélices solo son estables en presencia de Mg²⁺ (Vasquez et al., Biochemistry, 1995, 34, 7243-7251 ; Beal et Dervan, Science, 1991, 251, 1360-1363).

25 Como se ha indicado anteriormente, la secuencia específica puede ser una secuencia presente naturalmente sobre el ADN de doble-hebra, o una secuencia sintética introducida artificialmente en éste. Es particularmente interesante utilizar un oligonucleótido capaz de formar una triple-hélice con una secuencia presente naturalmente sobre el ADN de doble-hebra, por ejemplo en el origen de replicación de un plásmido o en un gen marcador. A este respecto, la solicitante ha efectuado análisis de secuencia de plásmidos y ha podido demostrar que algunas regiones de estos ADN, particularmente en el origen de replicación, podían poseer regiones homopurico-homopirimídicas. La síntesis de oligonucleótidos capaces de formar triples-hélices con estas regiones homopurico-homopirimídicas naturales permite ventajosamente aplicar el procedimiento de la invención a plásmidos no modificados, particularmente plásmidos comerciales de tipo pUC, pBR322, pSV, etc. Entre las secuencias homopuricas-homopirimídicas naturalmente presentes sobre un ADN de doble hebra, se puede citar una secuencia que comprende todo o parte de la secuencia 5'-CTTCCCGAAGGGAGAAAAGG-3'(SEQ ID n°2) presente en el origen de replicación ColE1 de E. coli. En este caso, el oligonucleótido que forma la triple hélice posee la secuencia : 5'-GAAGGGTTCTTCCCTCTTCC-3'(SEQ ID n°3) y se fija alternativamente sobre las dos hebras de la doble hélice, como es descrito por Beal y Dervan (J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 4976-4982) y Jayasena y Johnston (Nucleic Acids Res. 1992, 20, 5279-5288). Se puede citar también la secuencia 5'-GAAAAAGGAAGAG-3'(SEQ ID n°4) del gen de la β-lactamasa del plásmido pBR322 (Duval-Valentin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1992, 89, 504-508). La utilización de un oligonucleótido capaz de formar una triple-hélice con una secuencia presente en un origen de replicación o un gen marcador es particularmente ventajosa porque permite, con el mismo oligonucleótido, purificar todo ADN que contiene dicho origen de replicación o dicho gen marcador. Por lo tanto no es necesario modificar el plásmido o el ADN de doble-hebra para incorporarle una secuencia específica artificial.

35 Aunque se prefieren las secuencias perfectamente complementarias se entiende sin embargo que se pueden tolerar algunos desemparejamientos entre la secuencia del oligonucleótido y la secuencia presente sobre el ADN, en tanto en cuanto no conduzcan a una pérdida muy grande de afinidad. Se puede citar la secuencia 5'-AAAAAAGGGAATAAGGG-3'(SEQ ID n°8) presente en el gen de la β-lactamasa de E. coli. En este caso, la timina que interrumpe la secuencia polipúrica puede ser reconocida por una guanina de la tercera hebra, formando así un triplete ATG que es estable cuando está enmarcado por dos tripletes TAT (Kiesling et al., Biochemistry, 1992, 31, 2829-2834).

45 Según un modo de realización particular, los oligonucleótidos comprenden la secuencia (CCT)_n, la secuencia (CT)_n o la secuencia (CTT)_n, en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 15 incluidos. Es particularmente ventajoso utilizar secuencias de tipo (CT)_n o (CTT)_n. La solicitante ha mostrado en efecto que el rendimiento de purificación estaba influenciado por la cantidad de C en el oligonucleótido. En particular, como se ha indicado en el ejemplo 7, el rendimiento de purificación aumenta cuando el oligonucleótido contiene menos citosinas. Se entiende que los oligonucleótidos de la invención pueden igualmente combinar los restos (CCT), (CT) o (CTT).

55 El oligonucleótido utilizado puede ser natural (compuesto de base naturales, no modificadas) o estar modificado químicamente. En particular, el oligonucleótido puede presentar ventajosamente algunas modificaciones químicas que permiten aumentar su resistencia o su protección frente a las nucleasas, o su afinidad frene a la secuencia específica.

Se entiende también por oligonucleótido cualquier encadenamiento de nucleósidos que haya sufrido una modificación del esqueleto con el objeto de hacerle más resistente a las nucleasas. Entre las posibles modificaciones se pueden citar los oligonucleótidos fosfortioatos que son capaces de formar triples hélices con el ADN (Xodo et al., *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22, 3322-3330), así como los oligonucleótidos que poseen esqueletos formacetal o metilfosfonato (Matteucci et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 7767-7768). Se pueden utilizar igualmente los oligonucleótidos sintetizados con α -anómeros de nucleótidos, que forman igualmente triples hélices con el ADN (Le Doan et al., *Nucleic Acids Res.*, 1987, 15, 7749-7760). Otra modificación del esqueleto es el enlace fosforamidato. Se puede citar por ejemplo el enlace internucleotídico N3'-P5' fosforamidato descrito por Gryaznov y Chen, que da oligonucleótidos que forman con el ADN triples hélices particularmente estables (*J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 3143-3144). Entre las otras modificaciones del esqueleto, se puede citar igualmente la utilización de ribonucleótidos, de 2'-O-metilribosa, de fosfodiéster,...(Sun y Hélène, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1993, 3, 345-356). El esqueleto fosforado puede por último ser reemplazado por un esqueleto poliamida como en los PNA (ácido péptidonucleico, del inglés *Peptide Nucleic Acid*), que pueden formar igualmente triples hélices (Nielsen et al., *Science*, 1991, 254, 1497-1500; Kim et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 6477-6481) o por un esqueleto a base de guanidina, como en las DNG (desoxirribonucleico guanidina, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 1995, 92, 6097-6101), análogos policatiónicos del ADN, que forman igualmente triples hélices.

La timina de la tercera hebra puede también reemplazarse por un 5-bromouracilo, lo que aumenta la afinidad del oligonucleótido por el ADN (Povsic et Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 3059-3061). La tercera hebra puede contener igualmente bases no naturales, entre las que se puede citar la 7-deaza-2'-desoxixantosa (Milligan et al., *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21, 327-333), la 1-(2-desoxi- β -D-ribofuranosil)-3-metil-5-amino-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona (Koh y Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 1470-1478), la 8-oxoadenina, la 2-aminopurina, la 2'-O-metil-pseudoisocitidina, o cualquier otra modificación conocida por el experto en la materia (véase para revisión Sun y Hélène, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1993, 3, 345-356).

Otro tipo de modificación del oligonucleótido atiende más particularmente por objeto mejorar la interacción y/o la afinidad entre el oligonucleótido y la secuencia específica. En particular, una modificación completamente ventajosa consiste en metilar las citosinas del oligonucleótido (véase el ejemplo 5). El oligonucleótido así metilado presenta la propiedad destacada de formar una triple hélice estable con la secuencia específica en zonas de pH más próximas de la neutralidad (≥ 5). Permite por lo tanto trabajar a pH más elevados que los oligonucleótidos de la técnica anterior, es decir, a pH en los que los riesgos de degradación del ADN plasmídico sin muy inferiores.

La longitud del oligonucleótido utilizado en el procedimiento descrito es e al menos 3 bases, y de preferencia, está comprendido entre 5 y 30. Se utiliza de manera ventajosa oligonucleótido de longitud superior a 10 bases. La longitud puede ser adaptada caso por caso por el experto en la materia en función de la selectividad y de la estabilidad de la interacción buscadas.

Los oligonucleótidos descritos se pueden sintetizar por cualquier técnica conocida. En particular, pueden prepararse por medio de sintetizadores de ácidos nucleicos. Cualquier otro método conocido por el experto en la materia puede utilizarse, evidentemente.

Para permitir su acoplamiento covalente sobre el soporte, el oligonucleótido está generalmente funcionalizado. Así, puede estar modificado por un grupo terminal tiol, amino o carboxilo, en posición 5' o 3'. En particular, la adición de un grupo tiol, amino o carboxilo permite, por ejemplo, acoplar el oligonucleótido sobre un soporte que lleva las funciones disulfuro, maleimida, amina, carboxilo, éster, epóxido, bromuro de cianógeno o aldehído. Estos acoplamientos se forman por establecimiento de enlaces disulfuro, tioéter, éster, amida o amina entre el oligonucleótido y el soporte. Se puede utilizar cualquier otro método conocido por el experto en la materia, tal como reactivos de acoplamiento bifuncionales, por ejemplo.

Además, para mejorar la hibridación con el oligonucleótido acoplado, puede ser ventajoso que el oligonucleótido contenga un "brazo" y una secuencia de bases "espaciador". La utilización de un brazo permite en efecto fijar el oligonucleótido a una distancia elegida del soporte que permite mejorar sus condiciones de interacción con el ADN. El brazo está constituido ventajosamente por una cadena carbonada lineal, que comprende 1 a 18, y de preferencia 6 o 12 grupos (CH₂), y una amina que permite el enlace a la columna. El brazo está unido a un fosfato del oligonucleótido o a un "espaciador" compuesto de bases que no interfieren con la hibridación. Así, "el espaciador" puede comprender bases púricas. Como ejemplo, "el espaciador" puede comprender a secuencia GAGG. El brazo está compuesto ventajosamente de una cadena carbonada lineal que comprende 6 o 12 átomos de carbono.

Pueden utilizarse diferentes tipos de soportes. Se puede tratar de soportes de cromatografía funcionalizados, a granel o acondicionados previamente en columna, de superficies plásticas funcionalizadas o de bolas de látex funcionalizadas, magnéticas o no. Se trata preferentemente de soportes de cromatografía. Como ejemplo, los soportes de cromatografía que se pueden utilizar son agarosa, acrilamida o Dextrano así como sus derivados (tales como Séphadex, Sépharose, Superose,...), polímeros tales como poli(estirendivinilbenceno), o sílice injertada o no injertada, por ejemplo. Las columnas de cromatografía pueden funcionar en modo de difusión o de perfusión.

Para obtener mejores rendimientos de purificación, es particularmente ventajoso utilizar, sobre el plásmido, una secuencia que contiene varias posiciones de hibridación con el oligonucleótido. La presencia de varias posiciones de

hibridación favorece en efecto las interacciones entre dicha secuencia y el oligonucleótido, lo que conduce a mejorar los rendimientos de purificación. Así, para un oligonucleótido que contiene n repeticiones de restos (CCT), (CT) o (CTT), es preferible utilizar una secuencia de ADN que contiene al menos n restos complementarios y, de preferencia, n+1 restos complementarios. Una secuencia que lleva n+1 restos complementarios ofrece así dos posiciones de hibridación al oligonucleótido. Ventajosamente, la secuencia de ADN contiene hasta 11 posiciones de hibridación, es decir, n+10 restos complementarios.

El procedimiento según la presente descripción se puede utilizar para purificar cualquier tipo de ADN de doble hebra. Se trata por ejemplo de ADN circular, tal como un plásmido que lleva generalmente uno o varios genes de interés terapéutico. Este plásmido puede llevar igualmente un origen de replicación, un gen marcador, etc.... El procedimiento se puede aplicar directamente a un lisado celular. En este modo de realización, el plásmido, amplificado por transformación y después cultivo celular, se purifica directamente después de la lisis de las células. El procedimiento puede aplicarse igualmente a un lisado transparente, es decir, al sobrenadante obtenido después de la neutralización y centrifugado del lisado celular. Por supuesto se puede aplicar igualmente a una disolución purificada previamente por métodos conocidos. Este procedimiento permite también purificar el ADN, lineal o circular, que lleva una secuencia de interés, a partir de una mezcla que comprende ADN de diferentes secuencias. El procedimiento según la invención puede utilizarse igualmente para la purificación de ARN de doble hebra.

El lisado celular puede ser un lisado de células procariotas o eucariotas. Tratándose de células procariotas, se pueden citar por ejemplo las bacterias *E. coli*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* o *Streptomyces*. Tratándose de células eucariotas, se pueden citar las células animales, las levaduras, las setas, etc..., y más particularmente, las levaduras *Kluyveromyces* o *Saccharomyces* o las células COS, CHO, C127, NIH3T3, etc....

El procedimiento descrito es particularmente ventajoso ya que permite obtener, de manera rápida y sencilla, ADN plasmídico de muy alta pureza. En particular, como se ilustra en los ejemplos, este procedimiento permite separar eficazmente el ADN plasmídico considerado de componentes contaminantes, tales como el ADN cromosómico fragmentado, las endotoxinas, las proteínas, las nucleasas, etc.... Más particularmente, el procedimiento descrito permite obtener preparaciones de ADN de doble hebra, particularmente plasmídico, que tiene un contenido de ADN cromosómico inferior o igual a 0,5%. Incluso más preferentemente, las preparaciones de ADN obtenidas tienen un contenido de ADN cromosómico inferior o igual a 0,2%. Se describen por tanto composiciones que comprenden ADN plasmídico, utilizables farmacéuticamente particularmente en terapia génica o celular. A este respecto, se describe igualmente una composición farmacéutica que comprende ADN de doble hebra, lineal o plasmídico, preparado según el procedimiento descrito anteriormente.

Se describen igualmente preparaciones de ADN plasmídicos que tienen un contenido de ADN cromosómico inferior o igual a 0,5%, preferentemente a 0,2%, incluso más preferentemente a 0,1%.

Las composiciones pueden contener ADN plasmídico "desnudo" o asociado a vectores de transporte tales como liposomas, nanopartículas, lípidos catiónicos, polímeros, proteínas o virus recombinantes, etc.

La presente solicitud se describirá más detalladamente mediante los ejemplos que siguen, que deben considerarse ilustrativos y no limitativos.

Técnicas generales de clonación y de biología molecular.

Los métodos clásicos de biología molecular tales como las digestiones por enzimas de restricción, electroforesis sobre gel, transformación en *E. coli*, precipitación de ácidos nucleicos etc., se describen en la bibliografía (Maniatis et al., T., E. F. Fritsch, y J. Sambrook. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York ; Ausubel F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman y K. Struhl. 1987. *Current protocols in molecular biology 1987-1988*. John Willey and Sons, Nueva York.). Las secuencias nucleotídicas se han determinado por el método de terminación de cadenas siguiendo el protocolo ya presentado (Ausubel et al., 1987).

Las enzimas de restricción han sido proporcionadas por New-England Biolabs, Beverly, MA (Biolabs).

Para las ligaduras, los fragmentos de ADN se incuban en un tampón Tris-HCl pH 7,4 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 2 mM, en presencia de ADN ligasa del fago T4 (Biolabs,).

Los oligonucleótidos se sintetizan utilizando la química de las fosforamiditas protegidas en β por un grupo cianoetil (Sinha, N. D., J. Biernat, J. McManus y H. Köster. 1984. Polymer support oligonucleotide synthesis, XVIII: Use of β-cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. *Nucl. Acids Res.*, 12, 4539-4557 ; Giles, J. W. 1985. *Advances in automated DNA synthesis*. *Am. Biotechnol.*, Nov./Dec.) con el sintetizador automático de ADN Biosearch 8600 utilizando las recomendaciones del fabricante.

Los ADN ligados o que se van a ensayar para su eficacia de transformación se utilizan para transformar la cepa que se hace competente: *E. coli* DH5α [F'/endA1, hsdR17, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, Φ80dlac(lacZΔM15)]

1.3. Purificación de plásmido.

Material :

5 El plásmido pXL2563 (descrito en 1.2) se ha purificado sobre la columna HiTrap acoplada al oligonucleótido descrita en 1.1., a partir de una disolución que contiene igualmente el plásmido pBKS+. Los tampones utilizados durante esta purificación son los siguientes :

Tampón F : NaCl 2M, acetato 0,2 M, pH 4,5 a 5.

Tampón E : Tris 1 M, HCl pH 9, EDTA 0,5 mM.

Método:

10 La columna se lava con 6 ml de tampón F, a continuación los plásmidos (20 µg de pXL2563 y 20 µg de pBKS+ en 400 µl de tampón F) se aplican sobre la columna y se incuban dos horas a temperatura ambiente. La columna se lava con 10 ml de tampón F, a continuación la elución se hace con el tampón E. Los plásmidos se detectan después de electroforesis sobre gel de agarosa 1% y coloración con bromuro de etidio. Se estima la proporción de los plásmidos en las disoluciones por medición de su actividad transformante sobre E.coli.

Resultado:

15 Partiendo de una mezcla que contiene 30% de pXL2563 y 70% de pBKS+, se recupera a la salida de la columna una disolución al 100% de pXL2563. La pureza, estimada por la relación de D.O. a 260 y 280 nm, pasa de 1,9 a 2,5, lo que indica que se eliminan las proteínas contaminantes por este método.

Ejemplo 2.

20 2.1 - Este ejemplo describe un experimento de purificación de ADN plasmídico. El acoplamiento del oligonucleótido (5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3'(SEQ ID n°1)) sobre la columna se efectúa como se indica en el ejemplo 1. Para el acoplamiento, el oligonucleótido se modifica en el extremo 5' con un grupo amino unido al fosfato del espaciador por un brazo que contiene 6 átomos de carbono (oligonucleótido modificado Eurogentec SA Bélgica). El plásmido pXL2563 se ha purificado con ayuda del kit Wizard Megaprep (Promega Corp., Madison, WI) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Los tampones utilizados en este ejemplo son los siguientes:

25 Tampón F : NaCl 0-2M, acetato 0,2 M, pH 4,5-5.

Tampón E : Tris 1 M, HCl pH 9, EDTA 0,5 mM.

30 La columna se lava con 6 ml de tampón F, a continuación 100 µg de plásmido pXL2563 diluidos en 400 µl de tampón F se aplican sobre la columna y se incuban dos horas a temperatura ambiente. La columna se lava con 10 ml de tampón F, a continuación la elución se hace con el tampón E. El plásmido se cuantifica por medida de densidad óptica a 260 nm. En este ejemplo, la fijación se realiza en un tampón cuya molaridad en NaCl varía de 0 a 2M (tampón F). El rendimiento de purificación disminuye cuando la molaridad en NaCl decrece. El pH del tampón de fijación puede variar de 4,5 a 5, siendo el rendimiento de purificación mejor a 4,5. Se puede utilizar igualmente otro tampón de elución de pH básico: así la elución se ha realizado con un tampón borato 50 mM, pH 9, EDTA 0,5 mM.

35 2.2 - Se procede al acoplamiento del oligonucleótido: (5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3'(SEQ ID n°1)) sobre la columna como se indica en el ejemplo 1. El plásmido pXL2563 se ha purificado con ayuda del kit Wizard Megaprep (Promega Corp., Madison, WI) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Los tampones utilizados en este ejemplo son los siguientes:

Tampón F : NaCl 0,1M, acetato 0,2 M, pH 5.

Tampón E : Tris 1 M, HCl pH 9, EDTA 0,5 mM.

40 La columna se lava con 6 ml de tampón F, a continuación 100 µg de plásmido pXL2563 diluidos en 400 µl de tampón F se aplican sobre la columna y se incuban una hora a temperatura ambiente. La columna se lava con 10 ml de tampón F, a continuación la elución se hace con el tampón E. Se mide el nivel de ADN genómico o cromosómico de E. coli presente en las muestras de plásmido antes y después del paso sobre la columna de oligonucleótido. Este ADN genómico se cuantifica por PCR utilizando cebos en el gen galK de E. coli. Según el siguiente protocolo: La secuencia de estos cebos es descrita por Debouck et al. (Nucleic Acids Res., 1985, 13, 1841-1853) :

5'-CCG AAT TCT GGG GAC CAA AGC AGT TTC-3'(SEQ ID N° 24)

y 5'-CCA AGC TTC ACT GTT CAC GAC GGG TGT-3'(SEQ ID N°25).

50 El medio de reacción comprende, en 25 µl de tampón PCR (Promega France, Charbonnières) : 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dXTP (Pharmacia, Orsay) ; 0,5 µM en cebo; 20 U/ml Taq polimerasa (Promega). La reacción se efectúa siguiendo la secuencia :

- 5 min. a 95°C
- 30 ciclos de
 - 10 sec. a 95°C
 - 30 sec. a 60°C
- 5 1 min. a 78°C
- 10 min. a 78°C.

El fragmento de ADN amplificado, de una longitud de 124 pares de bases, se separa por electroforesis sobre gel de agarosa al 3% en presencia de SybrGreen I (Molecular Probes, Eugene, EE.UU.), a continuación se cuantifica por referencia a una gama de ADN genómico Ultrapur de *E. coli*, cepa B (Sigma, ref. D4889).

- 10 Se tiene 1% de ADN cromosómico en la muestra depositada sobre la columna, y 0,2% en la muestra purificada sobre la columna de oligonucleótido.

Ejemplo 3. Experimento sobre lisado transparente

- 15 Este ejemplo describe la purificación de ADN plasmídico a partir de un lisado transparente de cultivo bacteriano, a escala denominada "miniprep": 1,5 ml de un cultivo de noche, de cepas DH5 α que contienen el plásmido pXL2563, se centrifugan y el residuo se pone en suspensión en 100 μ l de glucosa 50 mM, Tris 25 mM HCl pH 8, EDTA 10 mM. Se añaden 200 μ l de NaOH 0,2 M, SDS 1%, los tubos se agitan por inversión, a continuación se añaden 150 μ l de acetato de potasio 3 M, pH 5 y los tubos se agitan por inversión. Después del centrifugado, el sobrenadante se recupera y se carga sobre la columna de oligonucleótido obtenida como se describe en el ejemplo 1. La fijación, los lavados y la elución son idénticos a los descritos en el ejemplo 1. Se recupera alrededor de 1 μ g de plásmido a partir de 1,5 ml de cultivo. El plásmido obtenido, analizado por electroforesis sobre gel de agarosa y coloración con bromuro de etidio se presenta en forma de una sola banda de ADN circular "super enrollado". No es detectable ninguna traza de ADN de peso molecular elevado (cromosómico), ni de ARN en el plásmido purificado por este método. La relación de las densidades ópticas a 260 y 280 nm es superior a 2.
- 20

Ejemplo 4.

- 25 4.1: Este ejemplo describe un experimento de purificación de ADN plasmídico realizado en las mismas condiciones que el ejemplo 3, a partir de 20 ml de cultivo bacteriano de cepas DH5 α que contienen el plásmido pXL2563. El residuo celular se recoge en 1,5 ml de glucosa 50 mM, Tris 25 mM HCl pH 8, EDTA 10 mM. La lisis se realiza con 2 ml de NaOH 0,2 M, SDS 1%, y la neutralización con 1,5 ml de acetato de potasio 3 M, pH 5. El ADN se precipita a continuación con 3 ml de propanolol-2, el residuo se recoge en 0,5 ml de acetato de sodio 0,2 M pH 5, NaCl 0,1M y se carga en la columna de oligonucleótido obtenida como se describe en el ejemplo 1. La fijación, el lavado de la columna y la elución se hacen como se describe en el ejemplo 1, con excepción del tampón de lavado cuya molaridad en NaCl es 0,1M. Se obtienen alrededor de 16 μ g de ADN plasmídico. El plásmido obtenido, analizado por electroforesis sobre gel de agarosa y coloración con bromuro de etidio se presenta en forma de una sola banda de ADN circular "super enrollado". No es detectable ninguna traza de ADN de peso molecular elevado (cromosómico), ni de ARN en el plásmido purificado. La digestión del plásmido por una enzima de restricción da una sola banda al peso molecular esperado de 3 kilobases. La concentración de proteínas en las muestras pasa de 125 μ g/ml en el lisado transparente a menos de 1 μ g/ml en el plásmido purificado (dosificación Micro-BCA, Pierce). La concentración de endotoxinas, estimada por la dosificación LAL (Biosepra) se divide por un factor superior a 10 en el plásmido purificado, con relación al lisado transparente de partida.
- 30
- 35

- 40 4.2 : El plásmido utilizado contiene una casete que contiene el promotor del Citomegalovirus, el gen que codifica la luciferasa, y la secuencia homopúrica-homopirimídica (GAA)¹⁷ procedente del plásmido pXL2563. La cepa DH1 (Maniatis et al., 1989) que contiene este plásmido se cultiva en un fermentador de 7 litros. Se prepara un lisado transparente a partir de 200 gramos de células: se recoge el residuo celular en 2 litros de Tris 25 mM, pH 6,8, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, a los que se añaden 2 litros de NaOH 0,2 M, SDS 1%. El lisado se neutraliza por adición de un litro de acetato de potasio 3M. Después de diafiltración 4 ml de este lisado se depositan en una columna HiTrap-NHS de 5 ml, acoplada al oligonucleótido de secuencia 5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (SEQ ID n° 1), según el método descrito en el ejemplo 1.1. El lavado y la elución se hacen como se describe en el ejemplo 1. Se recuperan alrededor de 400 microgramos de plásmido. El nivel de ADN genómico en esta muestra, medido por la técnica descrita en el ejemplo 2.2, es de 0,1%.
- 45

50

Ejemplo 5. Utilización de un oligonucleótido modificado

Este ejemplo describe la utilización de un oligonucleótido que lleva citosinas metiladas.

La secuencia del oligonucleótido utilizado es la siguiente:

5'-GAGGMeCTTMeCTTMeCTTMeCTTMeCTTMeCTT-3'(SEQ ID n° 12)

- 5 Este oligonucleótido posee un grupo NH₂ en 5'. MeC = 5 metilcitosina. Este oligonucleótido permite purificar el plásmido pXL2563 en las condiciones del ejemplo 1, con un tampón de fijación de pH 5 (se disminuye así el riesgo de degradación del plásmido).

Ejemplo 6 :

- 10 En los ejemplos anteriores, el oligonucleótido utilizado se modifica en el extremo 5'-terminal con un grupo amino unido al fosfato por un brazo que contiene 6 átomos de carbono: NH₂-(CH₂)₆. En este ejemplo, el grupo amino está unido al fosfato del extremo 5'-terminal por un brazo de 12 átomos de carbono: NH₂-(CH₂)₁₂. El acoplamiento del oligonucleótido y el paso sobre la columna se hacen como se indica en el ejemplo 2 con un tampón F: NaCl 2M, acetato 0,2 M, pH 4,5. Este oligonucleótido permite tener mejores rendimientos de purificación: se obtiene un
15 rendimiento de 53%, mientras que con el oligonucleótido de 6 átomos de carbono en las mismas condiciones este rendimiento es del orden de 45%.

Ejemplo 7:

Siguiendo la estrategia de clonación descrita en el ejemplo 1.2, se han construido otros dos plásmidos que llevan secuencias homopúricas-homopirimídicas: el plásmido pXL2725 que contiene la secuencia (GGA)₁₅ y el plásmido pXL2726 que contiene la secuencia (GA)₂₅.

20 Ejemplo 7.1 Construcción de los plásmidos

Los plásmidos pXL2725 y pXL2726, análogos al plásmido pXL2563, se han construido según la estrategia de clonación descrita en el ejemplo 1.2, utilizando las parejas de oligonucleótidos siguientes:

5986: 5'-GATCC(GA)₂₅GGG-3'(SEQ ID n°13)

5987: 5'-AATTCCC(TC)₂₅G-3'(SEQ ID n°14)

- 25 5981: 5'-GATCC(GGA)₁₇GG-3'(SEQ ID n°15)

5982: 5'-AATT(CCT)₁₇CCG-3'(SEQ ID n°16)

- 30 La pareja de oligonucleótidos 5986 y 5987 se ha utilizado para construir el plásmido pXL2726 clonando los oligonucleótidos en los sitios BamHI y EcoRI de pBKS+ (Stratagene Cloning System, La Jolla CA) mientras que los oligonucleótidos 5981 y 5982 se han utilizado para la construcción del plásmido pXL2725. Se han utilizado las mismas condiciones experimentales que para la construcción del plásmido pXL2563 y solo las parejas de oligonucleótidos se han cambiado. Igualmente, las secuencias clonadas se han verificado por secuenciación sobre los plásmidos. Esto ha permitido ver que el plásmido pXL2725 posee una modificación con relación a la secuencia esperada, en lugar de la secuencia GGA repetida 17 veces, hay GGAGA(GGA)₁₅(SEQ ID n°17).

Ejemplo 7.2 : Preparación de las columnas y Purificación

- 35 Los oligonucleótidos que forman triples hélices con estas secuencias homopúricas se han acoplado a columnas HiTrap según la técnica descrita en el ejemplo 1.1. Se trata del oligonucleótido de secuencia

5'-AATGCCTCCTCCTCCTCCTCCT-3'(SEQ ID n°18) para la purificación del plásmido pXL2725, y del oligonucleótido de secuencia

5'-AGTGCTCTCTCTCTCTCTCTCT-3'(SEQ ID n° 19) para la purificación del plásmido pXL2726.

- 40 Las dos columnas así obtenidas han permitido purificar los plásmidos correspondientes según la técnica descrita en el ejemplo 2, con los tampones siguientes:

Tampón F : NaCl 2M, acetato 0,2 M, pH 4,5.

Tampón E : Tris 1 M, HCl pH 9, EDTA 0,5 mM.

Los rendimientos obtenidos son de 23% y 31% para pXL2725 y pXL2726, respectivamente.

45

Ejemplo 8:

Este ejemplo ilustra la influencia de la longitud de la secuencia específica, presente sobre el plásmido, sobre los rendimientos de purificación.

Ejemplo 8.1: Construcción de los plásmidos.

- 5 El gen informador utilizado en estos experimentos para poner en evidencia la actividad de estas composiciones de la invención es el gen que codifica la luciferasa (Luc).

10 El plásmido pXL2621 contiene una casete que contiene el promotor del Citomegalovirus (CMV) de 661 bp extraído de pcDNA3 (Invitrogen, Corp., San Diego, CA) por corte con las enzimas de restricción MluI y HindIII, clonada más arriba del gen que codifica la luciferasa, en los sitios MluI y HindIII, en el vector pGL basic Vector (Promega Corp., Madison, WI). Este plásmido se ha construido utilizando las técnicas estándar de biología molecular.

Los plásmidos pXL2727-1 et pXL2727-2 se han construido de la siguiente manera.

Dos microgramos del plásmido pXL2621 se han linealizado por BamHI; la enzima se ha inactivado por un tratamiento de 10 min a 65°C; paralelamente los oligonucleótidos 6006 y 6008 se han hibridado como se describe en la presente memoria para la construcción del plásmido pXL2563.

- 15 6006 5'-GATCT(GAA)17CTGCAGATCT-3'(SEQ-ID n°20)

6008 5'-GATCAGATCTGCAG(TTC)17A-3'(SEQ ID n°21)

20 Esta mezcla de hibridación se ha clonado en los extremos BamHI del plásmido pXL2621 y después de la transformación en DH5α los clones recombinantes se han reparado por análisis por restricción enzimática por PstI ya que los oligonucleótidos introducen un sitio PstI. Se han retenido dos clones y la secuencia nucleotídica del fragmento clonado se ha verificado utilizando el cebador (6282, 5'-ACAGTCATAAGTGC GCGGACG-3'(SEQ ID n°22)) como cebo de reacción de secuencia (Viera J. y J. Messing, 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19:259-268)

El primer clon (pXL2727-1) contiene la secuencia GAA repetida 10 veces. El segundo (pXL2727-2) contiene la secuencia 5'-GAAGAAGAG(GAA)7GGAAGAGAA-3'(SEQ ID n°23).

- 25 Ejemplo 8.2: Preparación de las columnas y Purificación

Se utiliza una columna tal como la que se describe en el ejemplo 1 y que está acoplada al oligonucleótido 5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3'(SEQ ID n°1).

30 El plásmido pXL2727-1 lleva 14 repeticiones de la secuencia GAA. El oligonucleótido descrito anteriormente, que solo cuenta con 7 repeticiones de la secuencia de hibridación correspondiente CTT, puede por tanto hibridarse con el plásmido en 8 posiciones diferentes. El plásmido pXL2727-2 por el contrario, posee una secuencia hibridante (GAA)7 de la misma longitud que la del oligonucleótido fijado sobre la columna. Este oligonucleótido solo puede por lo tanto hibridarse en una sola posición sobre el pXL2727-2.

El experimento es idéntico al descrito en el ejemplo 2 con los tampones siguientes:

Tampón F : NaCl 2M, acetato 0,2 M, pH 4,5.

- 35 Tampón E :Tris 1 M, HCl pH 9, EDTA 0,5 mM.

El rendimiento de purificación es de 29% con el plásmido pXL2727-1 y de 19% con el pXL2727-2

Ejemplo 8.3: transfección in vitro de células de mamíferos.

40 Las células utilizadas son células NIH 3T3, sembradas la víspera del experimento en placas de cultivo de 24 pocillos, a razón de 50.000 células/pocillo. El plásmido se diluye en NaCl 150 mM y se mezcla con el lipofectante RPR115335. Se utiliza una relación de cargas positivas del lipofectante/cargas negativas del ADN igual a 6. La mezcla se somete a vórtex, se deja seis minutos a temperatura ambiente, se diluye en medio desprovisto de suero de vaca fetal, a continuación se añade a las células, a razón de 1µg de ADN por pocillo de cultivo. Después de dos horas a 37°C, se añade 10% volumen a volumen de suero de vaca fetal y las células se incuban 48 horas a 37°C en presencia de 5% de CO2. Las células se lavan dos veces con PBS y se mide la actividad luciferasa según el protocolo descrito (kit Promega, Promega Corp. Madison, WI), en un luminómetro Lumat LB9501 (EG et G Berthold, Evry). El plásmido pXL2727-1, purificado tal como se describe en el ejemplo 8.2, da rendimientos de transfección dos veces más importantes que los obtenidos con el mismo plásmido purificado con ayuda del kit Wizard Megaprep (Promega Corp. Madison, WI)

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIONES GENERALES:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: AVENTIS PHARMA S.A.
 - (B) CALLE: 20 Avenue Raymond Aron
 - (C) CIUDAD: ANTONY CEDEX
 - 10 (E) PAÍS: FRANCIA
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 92.165
 - (G) TELÉFONO: 40.91.69.22
 - (H) TELEFAX: 40.91.72.91
- 15 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: PURIFICACIÓN DE ADN POR FORMACIÓN DE TRIPLE HÉLICE CON UN OLIGONUCLEÓTIDO INMOVILIZADO
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 25
- 20 (iv) FORMA DE LECTURA EN ORDENADOR:
- (A) TIPO DE SOPORTE: Cinta
 - (B) ORDENADOR: PC compatible con IBM
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - 25 (D) PROGRAMA DE ORDENADOR: PatentIn Release nº 1.0, Versión 1.30 (OEB)

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID nº: 1:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 25 pares de bases
 - (B) TIPO: nucleótido
 - (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 - 35 (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 1:
- 40 GAGGCTTCTT CTTCTTCTTC TTCTT 25

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID nº: 2:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 19 pares de bases
 - (B) TIPO: nucleótido
 - (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 - 50 (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 2:
- 55 CTTCCCGAAG GGAGAAAGG 19

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID nº: 3:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
 - (B) TIPO: nucleótido
 - (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 - 65 (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 3:

GAAGGGTTCT TCCCTCTTTC C 21

5 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID n°: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 13 pares de bases
 (B) TIPO: nucleótido
 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 4:

GAAAAAGGAA GAG 13

20 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID n°: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 19 pares de bases
 (B) TIPO: nucleótido
 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 5:

AAGGGAGGGA GGAGAGGAA 19

35 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID n°: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 19 pares de bases
 (B) TIPO: nucleótido
 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 6:

AAGGAGAGGA GGGAGGGAA 19

50 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID n°: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 19 pares de bases
 (B) TIPO: nucleótido
 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 7:

TTGGTGTGGT GGGTGGGTT 19

65 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID n°: 8:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 17 pares de bases
 (B) TIPO: nucleótido
 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 8:
 AAAAAAGGGA ATAAGGG 17
- (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID nº: 9:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 58 pares de bases
 (B) TIPO: nucleótido
 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 9:
 GATCCGAAGA AGAAGAAGAA GAAGAAGAAG AAGAAGAAGA AGAAGAAGAA GAAGAAGG 58
- (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID nº: 10:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 58 pares de bases
 (B) TIPO: nucleótido
 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 10:
 AATTCCTTCT TCTTCTTCTT CTCTTCTTC TTCTTCTTCT TCTTCTTCTT CTTCTTCG 58
- (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID nº: 11:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 17 pares de bases
 (B) TIPO: nucleótido
 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 11:
 TGACCGGCAG CAAAATG 17
- (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID nº: 12:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 17 pares de bases
 (B) TIPO: nucleótido
 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) RASGO DISTINTIVO:

5 (D) OTRA INFORMACIÓN: todas las citosinas C de la secuencia están metiladas

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 12:

GAGGCTTCTT CTTCTTCTTC TTCTT 25

10 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID n°: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 58 pares de bases
 (B) TIPO: nucleótido
 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 13:

GATCCGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGGG 58

25 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID n°: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 58 pares de bases
 (B) TIPO: nucleótido
 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 14:

AATCCCTCT CTCTCTCTCT CTCTCTCTCT CTCTCTCTCT CTCTCTCTCT CTCTCTCG 58

40 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID n°: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

45 (A) LONGITUD: 58 pares de bases
 (B) TIPO: nucleótido
 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 15:

GATCCGGAGG AGGAGGAGGA GGAGGAGGAG GAGGAGGAGG AGGAGGAGGA GGAGGAGG 58

55 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID n°: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

60 (A) LONGITUD: 58 pares de bases
 (B) TIPO: nucleótido
 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 16:

AATTCCTCCT CCTCCTCCTC CTCCTCCTCC TCCTCCTCCT CCTCCTCCTC CTCCTCCG

58

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID nº: 17:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 50 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

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

15

GGAGAGGAGG AGGAGGAGGA GGAGGAGGAG GAGGAGGAGG AGGAGGAGGA

50

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID nº: 18:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 25 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

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

30

AATGCCTCCT CCTCCTCCTC CTCCT 25

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID nº: 19:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 26 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

40

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

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

45

AGTGCTCTCT CTCTCTCTCT CTCTCT 26

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID nº: 20:

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 66 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

55

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

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

60

GATCTGAAGA AGAAGAAGAA GAAGAAGAAG AAGAAGAAGA AGAAGAAGAA GAAGAAGCTGC
AGATCT

60
66

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID nº: 21

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

	(A) LONGITUD: 66 pares de bases	
	(B) TIPO: nucleótido	
	(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple	
	(D) CONFIGURACIÓN: lineal	
5	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 21:	
10	GATCAGATCT GCAGTTCTTC TTCTTCTTCT TCTTCTTCTT CTCTTCTTC TTCTTCTTCT TCTTCA	60 66
	(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID n°: 22	
15	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 21 pares de bases	
	(B) TIPO: nucleótido	
	(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple	
	(D) CONFIGURACIÓN: lineal	
20	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 22:	
25	ACAGTCATAA GTGCGGCGAC G 21	
	(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID n°: 23	
30	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 39 pares de bases	
	(B) TIPO: nucleótido	
	(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple	
	(D) CONFIGURACIÓN: lineal	
35	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 23:	
40	GAAGAAGAGG AAGAAGAAGA AGAAGAAGAA GGAAGAGAA	
	(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID n°: 24	
45	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 27 pares de bases	
	(B) TIPO: nucleótido	
	(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple	
	(D) CONFIGURACIÓN: lineal	
50	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 24:	
55	CCGAATTCTG GGGACCAAAG CAGTTTC 27	
	(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID n°: 25	
60	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 27 pares de bases	
	(B) TIPO: nucleótido	
	(C) NÚMERO DE HEBRAS: simple	
	(D) CONFIGURACIÓN: lineal	
65		

ES 2 446 983 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 25:

5 CCAAGCTTCA CTGTTACGA CGGGTGT 27

REIVINDICACIONES

1. Soporte para la purificación de un ADN de doble hebra, caracterizado por que dicho soporte está acoplado de manera covalente a un oligonucleótido capaz de formar por hibridación una triple hélice con una secuencia específica del ADN de doble hebra, comprendiendo dicho oligonucleótido una secuencia homopirimídica elegida entre la secuencia (CCT) n , la secuencia (CT) n , y la secuencia (CTT) n , en la que n es un número entre comprendido entre 1 y 15, caracterizado por que el oligonucleótido contiene un brazo constituido por una cadena carbonada lineal (CH₂) n , en donde n es un número entero comprendido entre 1 y 18, y por una amina capaz de formar un enlace covalente con el soporte, y un espaciador compuesto de bases que no interfieren con la hibridación, estando unido dicho espaciador a la secuencia homopirimídica y al brazo, y estando unido dicho brazo al soporte.
- 5 2. Soporte según la reivindicación 1, caracterizado por que el oligonucleótido comprende citosinas metiladas.
- 10 3. Soporte según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el soporte es un soporte de cromatografía funcionalizado, un soporte constituido por superficies plásticas funcionalizadas o un soporte constituido por bolas de látex funcionalizadas.
- 15 4. Soporte según la reivindicación 3, caracterizado porque el soporte es un soporte de cromatografía funcionalizado elegido entre agarosa, acrilamida, Dextrano, derivados de acrilamida, derivados de Dextrano, poli(estirendivinilbenceno), sílice injertada y sílice no injertada.
5. Soporte según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el oligonucleótido comprende una secuencia elegida entre las secuencias SEQ ID NO: 1, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, y SEQ ID NO: 26.
- 20 6. Procedimiento de preparación de un soporte según la reivindicación 1, que consiste en acoplar de manera covalente el oligonucleótido sobre dicho soporte.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado por que el oligonucleótido comprende citosinas metiladas.
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, caracterizado por que el oligonucleótido está funcionalizado.
- 25 9. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que el oligonucleótido está modificado por un grupo terminal tiol, amino o carboxilo en posición 5' o en 3'.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, caracterizado porque el soporte es un soporte de cromatografía funcionalizado, un soporte constituido por superficies plásticas funcionalizadas o bolas de látex funcionalizadas.
- 30 11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque el soporte es un soporte de cromatografía funcionalizado elegido entre agarosa, acrilamida, Dextrano, derivados de acrilamida, derivados de Dextrano, poli(estirendivinilbenceno), sílice injertada y sílice no injertada.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 10 u 11, caracterizado por que el soporte lleva funciones disulfuro, maleimido, amino, carboxilo, éster, epóxido, bromuro de cianógeno o aldehído.
- 35 13. Procedimiento de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, caracterizado por que dicho oligonucleótido comprende una secuencia elegida entre las secuencias SEQ ID N°: 1, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, y SEQ ID NO: 26.