

K I V O N A T

Eljárás tripla hélix formáció tisztítására immobilizált oligonukleotidon

A találmány tárgyát olyan új DNS tisztítási eljárás képezi, amely lehetővé teszi terápiás céllal felhasználható kettős-szálú DNS gyors tisztítását. Az eljárás a DNS szekvencia és egy oligonukleotid közötti specifikus kölcsönhatáson alapul. A találmány szerinti eljárás lehetővé teszi kettős-szálú DNS tiszta kinyerését más komponenseket is tartalmazó oldatból. Az eljárás lényege, hogy a tisztítandó kettős-szálú DNS-t tartalmazó oldatot olyan kovalensen kapcsolt oligonukleotidot tartalmazó hordozón vezetik át, amely nevezett kettős-szálú DNS-ben jelen levő specifikus szekvenciával hibridizálva, tripla hélix formációt hoz létre.

Az oligonukleotid és a kettős-szálú DNS specifikus szekvenciája közötti affinitás növelése és zavaró tényezők kiküszöbölése érdekében a hordozón rögzített oligonukleotid tartalmazhat módosításokat.

Az eljárás különösen alkalmas rekombináns úton nyert kettős-szálú DNS plazmidoknak a gazdaszervezetből eredő genomiális vagy kromoszómális DNS-től való megtisztítására. Kettős-szálú DNS-en kívül kettős-szálú RNS-ek tisztítására is alkalmazható.

Jellemezés a lra φ

Jellemezés

P0302565

Eljárás tripla hélix formáció tisztítására immobilizált oligonukleotidon

A találmány tárgyát DNS tisztítására szolgáló új eljárás képezi. A találmány szerinti eljárás lehetővé teszi gyógyszerészetileg felhasználható kettős-szálú DNS gyors tisztítását. Pontosabban, a találmány szerinti eljárás a DNS szekvencia és egy oligonukleotid közötti specifikus hibridizációt foglal magában.

Gén- és sejtterápiás technikák manapság figyelemre méltó fejlődésen mennek keresztül. Ezeknek a technikáknak velejárója nagy mennyiségű, gyógyszerészeti tisztaságú DNS előállításának a lehetősége. Ezekben az új terápiákban valójában a gyógyszer gyakran tartalmazza magát a DNS-t és elengedhetetlen annak megfelelő mennyiségben történő előállítása, izolálása és olyan mértékű tisztítása, hogy az emberi szervezetben terápiásan felhasználható legyen.

Az utóbbi években számos riport bemutatta plazmid DNS injektálásának a megvalósíthatóságát terápiás célra vagy vakcinálásra, szemléltetve, hogy különböző sejttípusok képesek DNS expressziós vektorokat felvenni és ezt követően ezen plazmidok által kódolt géneket kifejezni [Ledley, Hum. Gene Ther. 6, 1129 (1995)].

A génterápiában vagy vakcinálásban alkalmazott gének közé tartozhatnak például tumor szuppresszor gének, öngyilkos gének vagy antiszenz szekvenciák. Ezek kódolhatnak fehérjéket is, úgymint alfa-fetoproteint (AFP-t) [Morinaga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4604 (1983)], enzimeket, hormonokat, citokineket, növekedési faktorokat, úgymint FGF-t [Jouanneau et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 88, 2893 (1991)] vagy VEGFB-t [Olofsson et al., Proceedings 93, 576 (1996)], alvadási faktorokat, úgymint B-deletált VIII faktort [Truett et al., DNA 4, 333 (1985)], apolipoproteineket, neuro-transzmittereket, neurotróf faktorokat, természetes vagy kiméra immunglobulint. Riporter gének, úgymint az *Escherichia coli* β -galaktozidázt kódoló lacZ szintén használatosak.

Plazmid DNS, mint gént szállító vektor emberi szervezetben történő felhasználásának fő kihívásait ennek a terméknek az i) előállítása és ii) tisztasága jelenti. Plazmid vektorok nagy példányszámban történő előállítását *Escherichia coli* gazdaszervezetben nemrég kifejlesztették. A manapság használatos plazmidok vagy ColE1-ből származó plazmidok, úgymint pBR322, pUC vagy pBluescript [Lahijani et al., Hum. Gene Ther. 7, 1971 (1996)] vagy pCOR plazmidok [Soubrier et al., Gene Therapy 6, 1482 (1999)].

Plazmid DNS-nek, mint génterápiás vektornak a felhasználásával kapcsolatban felmerülő második gond a plazmid vektor tisztasága. A jelenleg használatos tisztítási módszerek, úgymint ultracentrifugálás CsCl gradienssel vagy kromatográfia nem mindig hatékony az olyan szennyezések, mint a gazdaszervezet genomiális DNS-e és RNS-e vagy fehérjék eltávolításában. Különösen nagyon nehéz a gazdaszervezet genomiális DNS-ének eltávolítása klasszikus kromatográfia alkalmazásával, mivel ennek kémiai szerkezete nagyon közel áll a plazmid DNS szerkezetéhez. Klasszikus kromatográfiával nyert plazmid készítményekben jellemzően 0,5-1%-ig található gazdaszervezet genomiális DNS. Ezért tehát humán génterápia céljára plazmid DNS, mint biztonságos vektor kifejleszt-

tése érdekében olyan tisztítási technológiákra van szükség, amelyek a gazdaszervezetből eredő genomiális DNS tartalmat jóval alacsonyabb szintekre, jellemzően 0,1%-ra, sőt 0,01%-ra vagy még alacsonyabbra csökkentik.

A találmány tárgyát egyszerű és különösen hatékony új DNS tisztítási eljárás képezi. Ez különösen nagy tisztaság elérését teszi lehetővé magas hozammal. A találmány szerinti eljárás alapvetően a tisztítandó DNS-be inszertált szekvencia és természetes vagy módosított bázisokból álló oligonukleotid közötti specifikus kölcsönhatáson alapul.

Azt már kimutatták, hogy bizonyos oligonukleotidok képesek specifikusan kölcsönhatásba lépni a DNS kettős hélix széles árkában, lokálisan tripla hélixet alkotva, amely a cél gének transzkripciójának gátlásához vezet [Hélène et Toulmé, *Biochim. Biophys. Acta* 99, 1049 (1990)]. Ezek az oligonukleotidok szelektíven felismerik a kettős hélixet oligopurin-oligopirimidin szekvenciáknál — olyan régiókban, ahol az egyik szálon oligopurin szekvencia, a komplementer szálon pedig oligopirimidin szekvencia található — és ezeknél helyileg tripla hélixet képeznek. A harmadik szál (az oligonukleotid) bázisai hidrogén hidakat (Hoogsteen vagy reverz Hoogsteen kötéseket) képeznek a Watson-Crick-féle bázispárok purinjaival.

Ilyen típusú kölcsönhatás felhasználását plazmid izoláláshoz már korábban leírták. Így például Ito és munkatársai [PNAS 89, 495 (1992)] leírják bizonyos plazmid szekvencia felismerésére képes biotinezett oligonukleotid felhasználását és ezzel történő tripla hélix kialakítást. Az így képzett komplexeket azután

érintkezésbe hozzák sztreptavidinnel bevont mágneses gyöngyökkel. A biotin és sztreptavidin közötti kölcsönhatás azután lehetővé teszi a plazmid izolálását a gyöngyök elúciót követő mágneses szeparálásával. Ennek a módszernek van azonban néhány hátránya. Két egymást követő specifikus kölcsönhatás létrejöttére van szükség, az első az oligonukleotid és a plazmid között, a második pedig a biotinezett komplex és a sztreptavidin gyöngyök között. Továbbá a végső oldat szennyezett lehet biotinezett oligonukleotiddal és így nem használható fel gyógyszerészeti készítményként.

A találmány tárgyát új, javított DNS tisztítási eljárás képezi, amely felhasználja a kölcsönhatásnak ezt a típusát. Még specifikusabban, a találmány szerinti eljárás hordozóhoz kovalensen kapcsolt oligonukleotidokat alkalmaz. Ez az eljárás különösen gyors, magas hozamokat és nagyfokú tisztaságot eredményez. Ezenkívül lehetővé teszi DNS tisztítását olyan komplex keverékekből, amelyek más nukleinsavakat, fehérjéket, endotoxinokat (úgy mint lipopoliszacharidokat), nukleázokat és hasonlókat tartalmaznak. A felhasznált hordozók ezenkívül könnyen megújíthatók és a kapott DNS-ek jobb gyógyszerbiztonsági sajátságokat mutatnak. Végül ez az eljárás, szemben az előző módszerekkel csak egy lépésből áll.

Ennélfogva a találmány első megvalósítása olyan kettős-szálú DNS tisztító eljárás, amely szerint a nevezett DNS-t egyéb komponensekkel keverten tartalmazó oldatot olyan oszlopon vezetjük végig, amelyhez a nevezett DNS-ben jelen levő specifikus szekvenciával hibridizáció révén tripla hélixet képező oligonuk-

leotid kovalensen kapcsolódik. A specifikus szekvencia előfordulhat természetes körülmények között a kettős-szálú DNS-ben vagy lehet mesterségesen bevezetett szintetikus szekvencia.

A találmányban felhasznált oligonukleotidok olyan oligonukleotidok, amelyek közvetlenül hibridizálnak a kettős-szálú DNS-sel. Ezek az oligonukleotidok a következő bázisokat tartalmazhatják

- timint (T), amely a kettős-szálú DNS A-T kettősével tripletet képezhet [Rajagopal et al., Biochem. 28, 7859 (1989)];
- adenint (A), amely a kettős-szálú DNS A-T kettősével tripletet képezhet;
- guanint (G), amely a kettős-szálú DNS G-C kettősével tripletet képezhet;
- protonált citozint (C+), amely a kettős-szálú DNS G-C kettősével tripletet képezhet [Rajagopal et al., Biochem. 28, 7859 (1989)];
- uracilt (U), amely A-U vagy A-T bázispárokkal képezhet tripletet.

A felhasznált oligonukleotid előnyösen citozinban gazdag homopirimidin szekvenciát tartalmaz és a DNS-ben jelen levő specifikus szekvencia homopurin-homopirimidin szekvencia. Citozinok jelenléte teszi lehetővé tripla hélix létrejöttét, amely savas pH-nál, ahol a citozinok protonált állapotban vannak stabil és alkálikus körülmények között, ahol a citozinok semlegesek destabilizált.

Ahhoz, hogy a tripla hélix hibridizációval létrejöhessen fontos, hogy az oligonukleotid és a DNS-ben jelen levő specifi-

kus szekvencia egymással komplementer legyen. Ebben az összefüggésben a legjobb hozam és a legjobb szelektivitás eléréséhez a találmány szerinti eljárásban olyan oligonukleotidot és specifikus szekvenciát alkalmazunk, amelyek teljes mértékben egymás komplementerei. Ez főleg poli(CTT) oligonukleotid és poli(GAA) speciális szekvencia lehet. Példaként megemlíthető a következő szekvenciájú oligonukleotid:

5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (GAGG(CTT)₇; 1. számú szekvencia), amelyben a GAGG bázisok nem alkotnak tripla hélixet, de lehetővé teszik az oligonukleotid elhelyezkedését a kapcsoló kartól eltekintve; a (CTT)₇ (26. számú szekvencia) szintén megemlíthető. Ezek az oligonukleotidok képesek tripla hélix kialakítására komplementer egységeket (GAA-t) tartalmazó specifikus szekvenciával. A szóban forgó szekvencia főleg olyan régió lehet, amely 7, 14 vagy 17 GAA egységet tartalmaz, a példákban leírtak szerint.

Egy másik különösen fontos szekvencia az

5'-AAGGGAGGGAGGAGAGGAA-3' (5. számú szekvencia). Ez a szekvencia tripla hélixet képez az **5'-AAGGAGAGGAGGGAGGGAA-3'** (6. számú szekvencia) vagy az **5'-TTGGTGTGGTGGGTGGGTT-3'** (7. számú szekvencia) oligonukleotidokkal.

Ebben az esetben az oligonukleotid ellentétes párhuzamos orientációban kötődik a polipurin szálhoz. Ezek a tripla hélixek csak Mg²⁺ jelenlétében stabilak [Vasquez et al., Biochem. 34, 7243-7251 (1995); Beal and Dervan, Science 251, 1360-1363 (1991)].

Fentiek szerint a specifikus szekvencia lehet a kettős-szálú DNS-ben természetesen előforduló szekvencia vagy később, mester-

ségesen bevezetett szintetikus szekvencia. Különösen előnyös olyan oligonukleotid alkalmazása, amely képes tripla hélix kialakítására a kettős-szálú DNS-ben természetesen előforduló szekvenciával, például egy plazmid replikációs origójában vagy marker génben. Ebben az összefüggésben plazmid szekvencia analízist végezve kimutatható volt, hogy ezen DNS-ek néhány régiója, különösen a replikációs origóban homopurin-homopirimidin régiókkal rendelkezett. Ezekkel a természetes homopurin-homopirimidin régiókkal tripla hélix kialakítására képes oligonukleotidok szintézise előnyösen lehetővé teszi a találmány szerinti eljárás alkalmazását módosítatlan plazmidokra, különösen a kereskedelemben kapható pUC, pBR322, pSV és hasonló plazmidokra. A kettős-szálú DNS-ben természetes körülmények között előforduló homopurin-homopirimidin szekvenciák között megemlíthető a ColE1 *E. coli* plazmid replikációs origójában jelen levő, egészében vagy részben az 5'-CTTCCCGAAGGGAGAAAGG-3' (2. számú szekvencia) szekvenciát tartalmazó szekvencia. Ebben az esetben a tripla hélixet alkotó oligonukleotid a következő szekvenciával rendelkezik: 5'-GAAGGGCTTCCCTCTTTCC-3' (3. számú szekvencia) és felváltva kapcsolódik a kettős hélix két szálához Beal és Dervan [J. Am. Chem. Soc. 114, 4976-4982 (1992)] és Jayasena és Johnston [Nucl. Acids Res. 20, 5279-5288 (1992)] leírása szerint. A pBR322 plazmid β -laktamáz gén 5'-GAAAAAGGAAGAG-3' szekvenciája szintén megemlíthető [Duval-Valentin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 504-508 (1992)].

Két további célszekvenciát azonosítottunk ColE1 és pCOR replikációs origókban, amelyek egyes oligonukleotidokkal triplex

szerkezet kialakítására képesek. ColE1-ből származó plazmidok 12-tagú homopurin szekvenciát (5'-AGAAAAAAGGA-3') (27. számú szekvencia) tartalmaznak a plazmid replikációban foglalt RNS-II transzkriptumtól upstream helyzetben [Lacatena et al., Nature 294, 623 (1981)]. Ez a szekvencia stabil triplex szerkezetet képez a 12-tagú komplementer 5'-TCTTTTTTTCCT-3' (28. számú szekvencia) oligonukleotiddal. A pCOR váz 14 nem ismétlődő bázis homopurin szakaszát (5'-AAGAAAAAAGAA-3') (29. számú szekvencia) tartalmazza, amely pCOR γ replikációs origójának az A + T-ben gazdag szegmensében helyezkedik el [Levchenko et al., Nucl. Acids Res. 24, 1936 (1996)]. Ez a szekvencia stabil triplex szerkezetet képez a 14-tagú komplementer 5'-TTCTTTTTTTTCTT-3' (30. számú szekvencia) oligonukleotiddal. A megfelelő oligonukleotidok 5'-TCTTTTTTTCCT-3' (28. számú szekvencia) és 5'-TTCTTTTTTTTCTT-3' (30. számú szekvencia) hatékonyan és specifikusan veszik célba a nekik megfelelő, vagy a ColE1 (ori) vagy a pCOR (ori γ) replikációs origókban elhelyezkedő komplementer szekvenciákat. Valójában egyetlen nem-kanonikus triád (T*GC vagy C*AT) a triplet szerkezet teljes destabilizációját eredményezheti.

Egy replikációs origóban vagy marker génben jelen levő szekvenciával tripla hélix kialakítására képes oligonukleotid felhasználása különösen előnyös, mivel lehetővé teszi a nevezett replikációs origót vagy nevezett marker gént tartalmazó bármely DNS tisztítását ugyanezzel az oligonukleotiddal. Ennélfogva nem feltétlenül szükséges a plazmid vagy a kettős-szálú DNS módosítása mesterséges specifikus szekvencia beépítéséhez.

Jóllehet teljes mértékben komplementer szekvenciákat részesí-

tünk előnyben, néhány párosodási hiba az oligonukleotid szekvenciája és a DNS-ben jelen levő szekvencia között tolerálható, amennyiben ez nem vezet túl nagy affinitás veszteséghez. Megemlíthető az *E. coli* β -laktamáz génben jelen levő 5'-AAAAAAGGGAATAAGGG-3' szekvencia (8. számú szekvencia). Ebben az esetben a polipurin szekvenciát megszakító timint felismerheti egy guanin a harmadik szálon, ezáltal G*TA tripletet alkotva, amely stabil, ha két T*AT triplet szegélyezi [Kiessling et al., Biochem. 31, 2829-2834 (1992)].

Egy speciális megvalósításban a találmány szerinti oligonukleotidok tartalmazzák a (CCT) $_n$, a (CT) $_n$ vagy a (CTT) $_n$ szekvenciát, amelyekben n 1-15 közötti szám. Különösen előnyös a (CT) $_n$ vagy (CTT) $_n$ típusú szekvenciák használata. Azt találtuk, hogy a tisztítás hozamát valójában az oligonukleotid C tartalma befolyásolta. A 7. példában bemutatott módon a tisztítás hozama növekszik, ha az oligonukleotid kevesebb citozint tartalmaz. Megjegyezzük, hogy a találmány szerinti oligonukleotidok kombinálhatják is a (CCT), (CT) vagy (CTT) egységeket.

A felhasznált oligonukleotid lehet természetes (módosítatlan, természetes bázisokból felépülő) vagy kémiaiilag módosított. Az oligonukleotid előnyösen rendelkezhet bizonyos kémiai módosításokkal, amelyek lehetővé teszik nukleázokkal szembeni rezisztenciáját vagy védelmét vagy megnövelik a specifikus szekvenciához való affinitását.

A találmány szerint oligonukleotidok alatt értünk olyan egymást követő, összekapcsolt nukleozidokat, amelyeknél a vázat nukleázokkal szembeni rezisztencia céljából módosítottuk. Lehet-

séges módosulatok között ugyanúgy megemlíthetők oligonukleotid foszfortioátok, amelyek képesek DNS-sel tripla hélix képzésre [Xodo et al., Nucl. Acids Res. 22, 3322-3330 (1994)], mint formacetál vagy metil-foszfónát vázzal rendelkező oligonukleotidok [Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc. 113, 7767-7768 (1991)]. Nukleotidok α anomerjeiből szintetizált oligonukleotidok is alkalmazhatók, amelyek DNS-sel szintén képeznek tripla hélixet [Le Doan et al., Nucl. Acids Res. 15, 7749-7760 (1987)]. A váz egy másik módosítása a foszforamidát kötés. Megemlíthető például a Gryaznov és Chen által leírt N3'-P5' nukleotidok közötti foszforamidát kötés, amely az oligonukleotidoknak a DNS-sel különösen stabil tripla hélix kialakítást tesz lehetővé [J. Am. Chem. Soc. 116, 3143-3144 (1994)]. A váz egyéb módosításai között ribonukleotidok, 2'-O-metil-ribóz, foszfo-diészter, stb. [Sun and Hélène, Curr. Opin. Struct. Biol. 116, 3143-3144] szintén említhető. Végül, a foszfor-alapú váz helyettesíthető poliamid vázzal, mint peptid nukleinsavakban (PNAs), amelyek szintén alkotnak tripla hélixeket [Nielsen et al., Science 254, 1497-1500 (1991); Kim et al., J. Am. Chem. Soc. 115, 6477-6481 (1993)] vagy guanidin-alapú vázzal, mint dezoxiribonuklein-guanidinben (DNGs) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 6097-6101 (1995)] vagy polikationos DNS analógokkal, amelyek szintén képeznek tripla hélixeket.

A harmadik szál timinje helyettesíthető 5-brómuracillal is, amely megnöveli az oligonukleotid DNS-sel szemben mutatott affinitását [Povsic and Dervan, J. Am. Chem. Soc. 111, 3059-3061 (1989)]. A harmadik szál is tartalmazhat nem természetes báziso-

kat, amelyek között megemlíthető a 7-dezaza-2'-dezoxixantozin [Milligan et al., Nucl. Acids Res. 21, 327-333 (1993)], 1-(2-dezoxi- β -D-ribofuranozil)-3-metil-5-amino-1*H*-pirazol[4,3-*d*]pirimidin-7-on [Koh and Dervan, J. Am. Chem. Soc. 114, 1470-1478 (1992)], 8-oxo-adenin, 2-amino-purin, 2'-O-metil-pszeudoizocitidin vagy bármilyen, a szakember által ismert egyéb módosítás [áttekintést lásd Sun and Héléne, Curr. Opin. Struct. Biol. 3, 345-356 (1993)].

Az oligonukleotid más típusú módosításának célja különösen az oligonukleotid és a specifikus szekvencia közötti kölcsönhatás és/vagy affinitás javítása. A találmány szerinti legelőnyösebb módosítás az oligonukleotid citozinjainak metilezéséből áll (lásd az 5. példát). Az így metilezett oligonukleotid figyelemre méltó sajátsággal rendelkezik stabil hélix kialakításában a specifikus szekvenciával, semlegeshez közeli pH tartományokban (≥ 5). Ezáltal lehetővé válik a munka a korábbi nukleotidokkal végzett-hez képest magasabb pH értékeknél, azaz olyan pH értékeknél, ahol a plazmid DNS-ek lebomlásának kockázata jóval kisebb.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott oligonukleotid hossza legalább 3 bázis, előnyösen 5-30 bázis. Előnyösen 10 bázisnál hosszabb oligonukleotidot alkalmazunk. A szakember minden egyes esetre meg tudja határozni az oligonukleotid hosszát, hozzáillesztve a kölcsönhatás kívánt szelektivitásához és stabilitásához.

Találmány szerinti oligonukleotidok bármilyen ismert technikával szintetizálhatók. Főleg nukleinsav szintetizálók segítségével készíthetők el. Nyilvánvalóan a szakember által ismert bármilyen más módszer is használható.

Az oligonukleotidot a hordozóhoz történő kovalens kapcsolódáshoz általában funkciós csoporttal látjuk el. Ehhez módosíthatjuk láncvégi (terminális) tiol, amin vagy karboxil csoporttal az 5' vagy 3' pozícióban. Főleg merkaptó-, amino- vagy karboxi-csoport hozzáadása teszi lehetővé az oligonukleotid hozzákapcsolását olyan hordozóhoz, amely diszulfid, maleimid, amin, karboxil, észter, epoxid, bróm-cián vagy aldehid funkciós csoportokkal rendelkezik. Ezek a kapcsolódások diszulfid, tioéter, észter, amid vagy amin kötések létrejöttével alakulnak ki az oligonukleotid és a hordozó között. A szakember által ismert bármilyen más módszer alkalmazható, úgymint például bifunkciós kapcsoló reagensek.

Továbbá a kapcsolt oligonukleotiddal történő hibridizáció javítása érdekében előnyös lehet, ha az oligonukleotid tartalmaz valamilyen „kar” és „hézag” bázisszekvenciát. Kar alkalmazása valójában lehetővé teszi az oligonukleotid egy megválasztott távolságban történő hozzákapcsolását a hordozóhoz, amely javítja a DNS-sel való kölcsönhatás körülményeit. A kar előnyösen lineáris szénláncból áll, amely 1-18, előnyösen 6-12 (CH₂) csoportot tartalmaz és egy amint, amely lehetővé teszi az oszlophoz történő hozzákapcsolását. A kar foszfát csoporton keresztül kapcsolódik az oligonukleotidhoz vagy olyan bázisokból álló „hézag”-hoz, amelyek nem zavarják a hibridizációt. Ilyenformán a „hézag” purin bázisokat tartalmazhat. A „hézag” tartalmazhatja például a GAGG szekvenciát. A kar előnyösen 6-12 szénatomot tartalmazó lineáris szénláncból áll.

A találmány megvalósításához különböző típusú hordozók hasz-

nálhatók. Ezek lehetnek funkciós kromatográfiás hordozók, ömlesztve vagy oszlopba csomagoltak, funkciós műanyag felületek vagy funkciós latex gyöngyök, mágnesesek vagy egyebek. Előnyösen kromatográfiás hordozókat alkalmazunk. Kromatográfiás hordozóként használható például agaróz, akrilamid vagy dextrán ugyanúgy, mint ezek származékai (úgy mint Sephadex, Sepharose, Superose stb.), polimerek, úgymint poli(sztírol/divinilbenzol) vagy ojtott vagy nem-ojtott szilikon. A kromatográfiás oszlopok működhetnek a diffúziós vagy perfúziós üzemmódban.

Jobb tisztítási hatásfok eléréséhez különösen előnyös a plazmidon több olyan szekvencia alkalmazása, amely az oligonukleotiddal hibridizáló pozíciókat tartalmaz. Több hibridizációs pozíció jelenléte valójában elősegíti a nevezett szekvencia és az oligonukleotid közötti kölcsönhatásokat, amelyek a tisztítási hatásfok javulásához vezetnek. Ezért olyan oligonukleotidhoz, amely n (CCT), (CT) vagy (CTT) ismétlődő motívumot tartalmaz, előnyösen olyan DNS szekvenciát alkalmazunk, amely legalább n , és előnyösen $n+1$ komplementer motívumot tartalmaz. Az $n+1$ komplementer motívumot tartalmazó szekvencia tehát két hibridizációs pozícióra ad lehetőséget az oligonukleotiddal. A DNS szekvencia előnyösen legalább 11 hibridizációs pozíciót tartalmaz, azaz $n+10$ komplementer motívumot.

A találmány szerinti eljárás felhasználható bármilyen típusú kettős-szálú DNS tisztítására. Az utóbbira egy példa a cirkuláris DNS, úgymint plazmid, amely általában egy vagy több, terápiás szempontból fontos gént hordoz. Ez a plazmid hordozhat replikációs origót, marker gént és hasonlókat is. A találmány

szerinti eljárás alkalmazható közvetlenül sejtlizátumra. Ebben a megvalósításban a transzformációt követő sejttenyésztéssel megszorozott plazmidot a sejtek lízise után közvetlenül tisztítjuk. A találmány szerinti eljárás alkalmazható tiszta lizátumra is, azaz a sejt lízisét követő semlegesítés és centrifugálás után kapott felülúszóra. Nyilvánvalóan alkalmazható más ismert módszerekkel előtisztított oldatra is. Ez az eljárás egyaránt lehetővé teszi lineáris és cirkuláris DNS által hordozott, szóban forgó szekvencia tisztítását különböző DNS-eket tartalmazó keverékből. A találmány szerinti eljárás felhasználható kettős-szálú DNS tisztítására is.

A sejtlizátum lehet prokarióta vagy eukarióta sejtek lizátuma.

Prokarióta sejtek tekintetében *E. coli*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* vagy *Streptomyces* baktériumok említhetők példaként. Eukarióta sejtek vonatkozásában állati sejtek, élesztők, gombák és hasonlóak említhetők, még specifikusabban *Kluyveromyces* vagy *Saccharomyces* élesztők vagy COS, CHO, C127, NIH3T3 és hasonló sejtvonalak.

A találmány szerinti eljárás különösen előnyös, mivel nagy tisztaságú plazmid DNS gyors és egyszerű kinyerését teszi lehetővé. A példákban szemléltetett módon ez az eljárás lehetővé teszi a szóban forgó plazmid DNS hatékony elválasztását szennyező komponensektől, úgymint fragmentált kromoszómális DNS-től, endotoxinoktól, fehérjéktől, nukleázoktól és hasonlóktól. Specifikusabban, a találmány szerinti eljárás lehetővé teszi — főleg plazmid eredetű — kettős-szálú DNS 0,5% vagy ennél kevesebb

kromoszómális DNS tartalommal történő kinyerését. Még specifikusabban, a kinyert DNS kromoszómális DNS tartalma 0,2% vagy ennél kevesebb. Ennélfogva a találmány — különösen génterápiában vagy sejttérápiában felhasználható — gyógyszerészetileg alkalmas plazmid DNS-t tartalmazó készítményeket ír le. Ebben az összefüggésben szintén a találmány tárgyát képezi az alábbi eljárás szerint elkészített — lineáris vagy plazmid eredetű — kettősszálú DNS-t tartalmazó gyógyszerészeti készítmény.

Szintén a találmány tárgyát képezik 0,5% vagy ennél kevesebb, előnyösen 0,2% vagy ennél kevesebb, még előnyösebben 0,1% vagy ennél kevesebb és még inkább előnyösen 0,01% vagy ennél kevesebb kromoszómális DNS-t tartalmazó plazmid DNS készítmények. Az alábbi példák szerint triplex affinitás közbenső lépést a tisztítási folyamatba klasszikus kromatográfiás lépések után építettük be. Ez az affinitás lépés jelentősen javítja a plazmid készítmény tisztaságát, bármilyen volt annak kezdeti tisztasága. Az oligonukleotid (kromatográfiás oszlophoz kovalensen kötött) és a szóban forgó, tisztítandó plazmid közötti triplex szerkezet kialakulása azon alapul, hogy a plazmid rendelkezik olyan szekvenciával, amely az oligonukleotiddal triplex szerkezet kialakítására képes. Ez a triplex szerkezet csak savas pH értéknél stabil, ahol az oligonukleotid citozinjai protonált állapotban vannak. A plazmid DNS azután egyszerűen eluálható az oszlopról a pH semlegesre emelésével.

A készítmények tartalmazhatnak „csupasz” vagy transzport hordozókkal — úgymint liposzómákkal, nanopartikulákkal, pozitív töltésű lipidekkel, polimerekkel, rekombináns vírusokkal vagy

fehérjékkel és hasonlókcal — kombinált plazmid DNS-t.

Egy megvalósításban a találmány szerinti eljárás felhasználható egy bizonyos típusú kettős-szálú DNS tisztítására olyan keverékből, amely két vagy több különböző típusú kettős-szálú DNS-t és szekvenciát tartalmaz. Ez az eljárás közvetlenül alkalmazható olyan sejtlizátumra, amelyben a kettős-szálú DNS-eket sejttenyésztés segítségével sokszoroztuk meg, és az elszaporított sejtek lízise után tisztítjuk. Ez az eljárás alkalmazható tiszta lizátumra is, azaz a sejt lízisét követő semlegesítés és centrifugálás után kapott felülúszóra. Az eljárás alkalmazható továbbá előtisztított oldatra.

Még pontosabban, első és második kettős-szálú DNS-t tartalmazó oldatból az első kettős-szálú DNS tisztítására szolgáló eljárás tartalmazza (i) az oldat átvezetését olyan első oszlopon, amely a második kettős-szálú DNS-sel — a benne levő specifikus szekvenciával történő hibridizáció révén — tripla hélix kialakítására képes, kovalensen kötött oligonukleotidot tartalmaz, (ii) az első oszlopon átvezetett — meg nem kötődött, első kettős-szálú DNS-ben feldúsult — oldat visszanyerését és (iii) a visszanyert oldat átvezetését olyan második oszlopon, amely nevezett első kettős-szálú DNS specifikus szekvenciájával hibridizáció révén tripla hélix kialakítására képes, kovalensen kötött oligonukleotidot tartalmaz. Megfelelő mosási lépést követően az első kettős-szálú DNS eluálható a második oszlopról. Ezt a kétlépéses tisztítási eljárást alkalmazva, az első kettős-szálú DNS kimutatható mennyiségű második kettős-szálú DNS-től mentesen nyerhető vissza a második oszlopról.

A találmány egy specifikus megvalósításában az első kettős-szálú DNS molekula az 5'-AAGAAAAAAAAAGAA-3' (29. számú szekvencia) szekvenciával rendelkező pCOR plazmid, amely az 5'-TTCTTTTTTTTCTT-3' (30. számú szekvencia) szekvenciájú oligonukleotiddal stabil triplex szerkezetet képez. A második kettős-szálú DNS molekula az 5'-AGAAAAAAAAAGGA-3' (27. számú szekvencia) szekvenciával rendelkező, ColE1-ből származó plazmid, amely az 5'-TCTTTTTTTCCT-3' (28. számú szekvencia) szekvenciájú oligonukleotiddal képez triplexet. Ennek megfelelően a pCOR plazmid előnyösen megtisztítható más plazmidokat, úgymint ColE1-ből származó plazmidot tartalmazó oldatból a találmány szerinti kétlépéses tisztítási módszer alkalmazásával.

A találmányt részletesebben leírjuk a következő példák segítségével, amelyek szemléltetésként szolgálnak és nem jelentik az oltalmi kör korlátozását.

Általános klónozási és molekuláris biológiai technikák

A hagyományos molekuláris biológiai módszerek, úgymint restrikciós enzimes emésztés, gélelektroforézis, transzformálás *E. coli*-ba, nukleinsavak precipitációja és hasonlóak leírása megtalálható az irodalomban [Maniatis, Fritsch and Sambrook, Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989); Ausubel et al., Current protocols in molecular biology, Wiley and Sons, NY (1987)]. Nukleotid-szekvenciák meghatározását lánc terminációs módszerrel már szintén publikálták [Ausubel et al., (1987)].

A restrikciós enzimeket a New England Biolabs (Beverly, MA) cégtől szereztük be.

A ligációk elvégzéséhez DNS fragmentumokat inkubálunk 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 2 mM ATP keverékét tartalmazó pufferben, fág T4 DNS ligáz (Biolabs) jelenlétében.

Oligonukleotidokat szintetizálunk foszforamidit reakcióval, a foszforamidit β pozícióját cianoetil csoporttal védve [Sinha et al., Nucl. Acids Res. 12, 4539-4557 (1984); Giles, Am. Biotechnol. Nov/Dec (1985)] Biosearch 8600 automata DNS szintetizáló segítségével a gyártó utasításai szerint.

Transzformációs hatékonyságukra nézve vizsgálandó, ligált DNS-eket vagy RNS-eket használunk fel a következő, kompetenssé tett törzs transzformálására:

E. coli DH5 α [F/endA1, hsdR17, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, Φ 80dlac(lacZ Δ M15)] (bármilyen ColE1 plazmidhoz); vagy *E. coli* XAC-pir (bármilyen pCOR-ből származó plazmidhoz).

Plazmid DNS mini preparátumait készítjük el Klein és munkatársai szerint [Klein et al., (1980)].

LB tápközeget használunk az *E. coli* törzsek tenyésztésére [Maniatis et al., (1982)]. A törzseket 37 °C-on inkubáljuk. A baktériumokat megfelelő antibiotikumokkal kiegészített LB tápközegből készült lemezekre szélesztjük.

1. példa

1.1. Az oszlop elkészítése

Berendezés

Az általunk használt oszlop NHS-sel (N-hidroxiszukcinimid; Pharmacia) aktivált 1 ml-es HiTrap oszlop, amely perisztaltikus pumpához kapcsolódik (kimenet < 1 ml/min). Az alkalmazott specifikus oligonukleotid az 5'-végén amino csoportot tartalmaz,

leírtak szerint.

Az ennek a két hibridizált oligonukleotidnak megfelelő szekvenciát klónoztuk az ampicillin rezisztencia gént hordozó pBKS+ plazmid (Stratagene Cloning System, La Jolla, CA) összetett klónozó helyére. Ebből a célból az oligonukleotidokat a következő módon hibridizáltuk: e két oligonukleotid 1 µg-ját együtt 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂ összetételű végső puffer 40 ml-ébe helyeztük. Ezt a keveréket 95 °C-ra melegítettük fel, azután szobahőmérsékletre helyeztük oly módon, hogy a hőmérséklet lassan csökkenjen. A hibridizált oligonukleotidok keverékének 10 ng-ját ligáltuk 200 ng pBKS+ plazmiddal (Stratagene Cloning System, La Jolla, CA) és emésztettük *Bam*HI és *Eco*RI restriktációs enzimekkel 30 µl végső térfogatban. Ligáció után egy kis részletet DH5α-ba transzformáltunk. A transzformációs keverékeket ampicillinnel (50 mg/l) és X-gallal (20 mg/l) kiegészített L tápközegre szélesztettük. A rekombináns klónoknak kék színtől mentesnek kell lenniük ezen a tápközegen, ellentétben a szülői plazmiddal (pBKS+), amely lehetővé teszi *E. coli* β-galaktozidáz ω fragmentumának α-komplementációját. Plazmid DNS 6 klónból történő mini preparációját követően ezek mindegyike mutatta a pBKS+ plazmid *Eco*RI és *Bam*HI helyei között elhelyezkedő *Pst*I hely eltűnését és az összetett klónozó helyet tartalmazó 448 bp *Pvu*II sáv molekulatömeg növekedését. Kiválasztottunk egy klónt és a megfelelő plazmidot pXL2563 jelzéssel láttuk el. A klónozott szekvenciát szekvenálással igazoltuk, primer-20: 5'-TGACCGGCAGCAAAATG-3' (11. számú szekvencia) [Viera and Messing, *Gene* 19, 259-268 (1982)] alkalmazásával. A pUC plazmidok M13mp7-ből származó rendszerek

pBKS+ plazmid (Stratagene Cloning System, La Jolla, CA) inszerciós mutagenéziséhez és szintetikus univerzális primerekkel történő szekvenálásához. A pXL2563 plazmidot Wizard Megaprep kit (Promega Corp. Madison, WI) segítségével tisztítottuk a gyártó utasításai szerint. Ezt a plazmid DNS preparátumot használtuk azután az alábbiakban leírt példákban.

1.3. Plazmid tisztítás

Berendezés

Az 1.2. fejezetben leírt pXL2563 plazmidot az 1.1. fejezetben leírt oligonukleotiddal kapcsolt HiTrap oszlopon tisztítottuk a pBKS+ plazmidot is tartalmazó oldatból. A tisztításhoz használt pufferek a következők voltak:

F puffer: 2 M NaCl, 0,2 M acetát, pH 4,5-5;

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

Módszer

Az oszlopot 6 ml F pufferrel mossuk, a plazmidokat (20 µg pXL2563 és 20 µg pBKS+ 400 µl F pufferben) felvisszük az oszlopra és 2 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáljuk. Az oszlopot 10 ml F pufferrel mossuk és azután E pufferrel eluáljuk. A plazmidokat 1% agaróz gélen végzett elektroforézist és etídium-bromidos festést követően mutatjuk ki. A plazmidok arányát az oldatban *E. coli* transzformáló aktivitásuk mérésével becsüljük meg.

Eredmény

30% pXL2563 és 70% pBKS+ plazmid keverékből kiindulva 100% pXL2563 tartalmú oldatot nyerünk az oszlop alján. A 260 nm-en és 280 nm-en mért optikai denzitással (OD-vel) becsült tisztaság 1,9 és 2,5 közötti, amely azt jelzi, hogy szennyező fehérjék el-

távoztak ezzel a módszerrel.

2. példa

2.1. Ez a példa egy plazmid DNS tisztítási kísérletet mutat be. Az oligonukleotid [5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (1. számú szekvencia)] hozzákapcsolását az oszlophoz az 1. példában leírtak szerint végezzük. A kapcsoláshoz módosítjuk az oligonukleotidot az 5'-végen, egy amino csoportot kötünk a hézag foszfát csoportjához 6 szénatomot tartalmazó kar segítségével (Modified oligonucleotide Eurogentec SA, Belgium). A pXL2563 plazmidot Wizard Megaprep kit (Promega Corp. Madison, WI) segítségével tisztítottuk a gyártó utasításai szerint. Ebben a példában a következő puffereket használjuk:

F puffer: 2 M NaCl, 0,2 M acetát, pH 4,5-5;

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

Az oszlopot 6 ml F pufferrel mossuk, 100 µg pXL2563 plazmidot 400 µl F pufferben hígítva felviszünk az oszlopra és 2 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáljuk. Az oszlopot 10 ml F pufferrel mossuk, és azután E pufferrel eluáljuk. A plazmid mennyiségét 260 nm-en történő optikai denzitás méréssel határozzuk meg.

Ebben a példában a kötést olyan pufferben végezzük, amelynek molaritása NaCl-ra 0-2 M közötti (F puffer). A tisztítás hatásfoka csökken, ha csökken a NaCl molaritása. A kapcsoló puffer pH-ja 4,5 és 5 között változhat, a tisztítás hatásfoka jobb 4,5 pH értéknél. Másik, bázikus pH-jú elúciós puffer is alkalmazható: ilyenformán elúciót végeztünk 50 mM borát pH 9, és 0,5 mM EDTA keverékével.

2.2. Az oligonukleotid [5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (1. számú szekvencia)] hozzákapcsolását az oszlophoz az 1. példában leírtak szerint végezzük. A pXL2563 plazmidot Wizard Megaprep kit (Promega Corp. Madison, WI) segítségével tisztítottuk a gyártó utasításai szerint. Ebben a példában a következő puffereket használjuk:

F puffer: 0,1 M NaCl, 0,2 M acetát, pH 5;

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

Az oszlopot 6 ml F pufferrel mossuk, 100 µg pXL2563 plazmidot 400 µl F pufferben hígítva felviszünk az oszlopra és 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáljuk. Az oszlopot 10 ml F pufferrel mossuk és azután E pufferrel eluáljuk. A plazmid mintákban jelen levő *E. coli* genomiális vagy kromoszómális DNS tartalmát mérjük az oligonukleotiddal kapcsolt oszlopon való átáramoltatás előtt és után. Ennek a genomiális DNS-nek a mennyiségét PCR-rel határozzuk meg, primereket alkalmazva az *E. coli* galk génben. A következők szerint járunk el. Ezeknek a primereknek a szekvenciáját:

5'-CCGAATTCTGGGGACCAAAGCAGTTTC-3' (24. számú szekvencia) és

5'-CCAAGCTTCACTGTTACGACGGGTGT-3' (25. számú szekvencia)

Debouck és munkatársai írják le [Nucl. Acids Res. 13, 1841-1853 (1985)]. A reakcióelegy 25 µl PCR pufferben (Promega France, Charbonnières) 1,5 mM MgCl₂-ot, 0,2 mM dXTP-t (Pharmacia, Orsay), 0,5 µM primert és 20 E/ml Taq polimerázt (Promega) tartalmaz. A reakciót a következő sorrendben végezzük:

- 5 perc 95 °C-on;
- 30 ciklus 10 másodperc 95 °C-on,

- 30 másodperc 60 °C-on,
1 perc 78 °C-on;
- 10 perc 78 °C-on.

A megsokszorozott, 124 bázispár hosszúságú DNS fragmentumot 3% agaróz gélen elektroforézissel szeparáljuk SybrGreen I (Molecular Probes, Eugene, USA) jelenlétében, azután mennyiségi meghatározást végzünk *E. coli* B törzsből származó Ultrapur genomiális DNS sorozattal (Sigma, ref D4889) történő összehasonlítással.

Az oszlopra történt felvitel előtt a mintában 1% kromoszómális DNS volt, az oligonukleotid oszlopon megtisztított mintában pedig 0,2%.

3. példa

Kísérlet tiszta lizátummal

Ez a példa plazmid DNS tisztítását írja le baktérium tenyészet tiszta lizátumából, az úgynevezett „miniprep” léptékben. A pXL2563 plazmidot tartalmazó DH5α törzs egyéjszakás tenyészetének 1,5 ml-ét centrifugáljuk és a pelletet újra szuszpendáljuk 50 mM glükóz, 25 mM Tris-HCl, pH 8 és 10 mM EDTA keverékének 100 µl-ében. 0,2 M NaOH, 1% SDS elegyének 200 µl-ét adjuk hozzá, összekeveréshez a csöveket megfordítjuk, ezután 150 µl 3 M kálium-acetátot (pH 5) adunk hozzá és összekeveréshez a csöveket megfordítjuk. Centrifugálás után a felülúszót kinyerjük és az 1. példában leírtak szerint felvisszük az oligonukleotiddal kapcsolt oszlopra. A kötés, mosás és elúció azonos az 1. példában leírtakkal. 1,5 ml tenyészetből körülbelül 1 µg plazmidot nyerünk ki. A kapott, agaróz gélelektroforézissel és etídium-

bromidos festéssel analizált plazmid „szupercsavarodott” cirkuláris DNS egyedi sávjaként jelenik meg. Az ezzel az eljárással tisztított plazmidban nincsen nyoma nagymolekulájú (kromoszómális) DNS-nek vagy RNS-nek. A 260 nm-en és 280 nm-en mért optikai denzitás aránya nagyobb mint 2.

4. példa

4.1. Ez a példa plazmid DNS tisztítási módszert ír le ugyanolyan körülmények között, mint a 3. példában, a pXL2563 plazmidot tartalmazó DH5 α baktérium törzs 20 ml tenyészetéből kiindulva. A sejt pelletet 50 mM glükóz, 25 mM Tris-HCl, pH 8 és 10 mM EDTA keverékének 1,5 ml-ében vesszük fel. A lízist 0,2 M NaOH, 1% SDS elegyének 2 ml-ében hajtjuk végre és 1,5 ml 3 M kálium-acetáttal (pH 5) semlegesítjük. A DNS-t ezután 3 ml 2-propanollal kicsapjuk és a pelletet 0,2 M nátrium-acetát (pH 5) és 0,1 M NaCl elegyének 0,5 ml-ében újra felvesszük, majd az 1. példában leírtak szerint kapott, oligonukleotiddal kapcsolt oszlopra visszük fel. A kötés, mosás és elúció azonos az 1. példában leírtakkal, kivéve a mosó puffert, amelynek a molaritása NaCl-ra 0,1 M. Körülbelül 16 μ g plazmid DNS-t kapunk. A kapott, agaróz gélelektroforézissel és etídium-bromidos festéssel analizált plazmid „szupercsavarodott” cirkuláris DNS egyedi sávjaként jelenik meg. Az ezzel az eljárással tisztított plazmidban nincsen nyoma nagymolekulájú (kromoszómális) DNS-nek vagy RNS-nek. A plazmid restrikciós enzimes emésztése egyedi sávot ad a várt 3 kilobázis molekulatömegnél. A fehérje koncentráció a mintákban a tiszta lizátumban mért 125 μ g/ml értékről a tisztított plazmidban kevesebb, mint 1 μ g/ml-re csökken (Micro-BCA Assay, Pierce).

Az endotoxin koncentráció LAL meghatározással (LAL Assay, Biosepra) mérve 10-nél nagyobb faktoral osztódik a tisztított plazmidban a kiindulási tiszta lizátumhoz képest.

4.2. A felhasznált plazmid tartalmaz egy, a citomegalovírus promótert, a luciferázt kódoló gént és a pXL2563 plazmidból eredő, homopurin-homopirimidin szekvenciát (GAA)₁₇-t (33. számú szekvenciát) magában foglaló kazettát. Az ezt a plazmidot tartalmazó DH1 törzset [Maniatis et al., (1989)] 7 literes fermentorban tenyésztjük. Tiszta lizátumot készítünk 200 g sejt-ből: a sejt pelletet felvesszük 2 liter 25 mM Tris, pH 6,8, 50 mM glükóz, 10 mM EDTA keverékében, amelyhez 2 liter 0,2 M NaOH, 1% SDS elegyét adjuk. A lizátumot 1 liter 3 M kálium-acetát hozzáadásával semlegesítjük. Dialízist követően ennek a lizátumnak 4 ml-ét visszük fel 5 ml-es HiTrap-NHS oszlopra, amelyhez az 1.1. példában leírtak szerint az 5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (1. számú szekvencia) szekvenciával rendelkező oligonukleotid kapcsolódik. A mosást és elúciót az 1. példában leírtak szerint végezzük. Körülbelül 400 µg plazmidot nyerünk ki. A genomiális DNS szintje ebben a mintában — a 2.2. példában leírt technikával mérve — 0,1%.

5. példa

Módosított oligonukleotid alkalmazása

Ez a példa olyan oligonukleotid alkalmazását írja le, amely metilezett citozinokat tartalmaz. Az oligonukleotid szekvenciája a következő: 5'-GAGG^{Me}CTT^{Me}CTT^{Me}CTT^{Me}CTT^{Me}CTT^{Me}CTT^{Me}CTT^{Me}CTT-3' (12. számú szekvencia).

Ez az oligonukleotid az 5'-végén amino csoportot tartalmaz.

^{Me}C = 5-metil-citozin. Ez az oligonukleotid lehetővé teszi a pXL2563 plazmid tisztítását az 1. példában leírt körülmények között, 5 pH-jú kapcsoló pufferrel (ezáltal csökken a plazmid lebomlásának kockázata).

6. példa

A fenti példákban az alkalmazott oligonukleotid az 5'-végén amino csoporttal módosított, amely egy 6 szénatomos karon keresztül ($\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6$) kötődik a foszfát csoporthoz. Ebben a példában az amino csoport az 5'-végi foszfáthoz egy 12 szénatomos karon keresztül ($\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_{12}$) kapcsolódik. Az oligonukleotid kapcsolása és az oszlopon történő átáramoltatás a 2. példában leírtak szerint történik F pufferrel (2 M NaCl, 0,2 M acetát, pH 4,5). Ez az oligonukleotid jobb tisztítási hatásfok elérését teszi lehetővé, 53%-os hozamot kapunk, míg a 6 szénatomos kart tartalmazó oligonukleotiddal ugyanolyan körülmények között ez a hozam 45%.

7. példa

Az 1.2. példában leírt klónozó stratégiát követve két másik, homopurin-homopirimidin szekvenciát hordozó plazmidot állítottunk össze: a pXL2725 plazmidot, amelynek a szekvenciája $(\text{GGA})_{16}$ (34. számú szekvencia) és a pXL2726 plazmidot, amelynek a szekvenciája $(\text{GA})_{25}$ (35. számú szekvencia).

7.1. A plazmidok összeállítása

A pXL2725 és pXL2726 plazmidot a pXL2563 plazmidhoz hasonlóan az 1.2. példában leírt klónozó stratégia szerint állítottuk össze, a következő oligonukleotid párok felhasználásával:

5986: 5'-GATCC(GA)₂₅GGG-3' (13. számú szekvencia),

5987: 5'-AATTCCC(TC)₂₅G-3' (14. számú szekvencia),

5981: 5'-GATCC(GGA)₁₇GG-3' (15. számú szekvencia),

5982: 5'-AATT(CCT)₁₇CCG-3' (16. számú szekvencia).

Az 5986 és 5987 oligonukleotid párt használtuk a pXL2726 plazmid összeállítására, a pBKS+ plazmid (Stratagene Cloning System, La Jolla, CA) *Bam*HI és *Eco*RI helyére klónozva az oligonukleotidokat, míg az 5981 és 5982 oligonukleotidokat a pXL 2725 plazmid összeállításához használtuk fel. Ugyanazokat a kísérleti körülményeket biztosítottuk, mint a pXL2563 összeállításánál, csak az oligonukleotid párokat cseréltük. Ehhez hasonlóan, a klónozott szekvenciákat a plazmidokon végzett szekvenálással igazoltuk. Ez láthatóvá teszi, hogy a pXL2725 plazmid módosítást tartalmaz a várt szekvenciához képest: a 17-szer ismétlődő GGA szekvencia helyett GGAGA(GGA)₁₅ (17. számú szekvencia).

7.2. Az oszlopok elkészítése és tisztítás

Ezekkel a homopurin szekvenciákkal tripla hélixeket képező oligonukleotidokat HiTrap oszlopokhoz kapcsoltuk az 1.1. példában leírt technika szerint. Az 5'-AATGCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT-3' (18. számú szekvencia) szekvenciájú oligonukleotidot használtuk fel a pXL2725 plazmid tisztítására és az 5'-AGTGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT-3' (19. számú szekvencia) szekvenciájú oligonukleotidot használtuk fel a pXL2726 plazmid tisztítására.

Az így kapott két oszlop lehetővé teszi a megfelelő plazmidok tisztítását a 2. példában leírt technika szerint a következő pufferekkel:

F puffer: 2 M NaCl, 0,2 M acetát, pH 4,5

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

A kapott hozamok 23% és 31%, pXL2725-re és pXL2726-ra külön-külön.

8. példa

Ez a példa szemlélteti a plazmidban jelen levő specifikus szekvencia hosszúságának befolyását a tisztítás hatásfokára.

8.1. A plazmidok összeállítása

A találmány szerinti készítmények aktivitását jelző, ezekben a kísérletekben használt riporter gén a luciferázt kódoló gén (Luc).

A pXL2621 plazmid tartalmaz egy kazettát, amely magában foglalja a pcDNA3-ból (Invitrogen Corp., San Diego, CA) *Mlu*I és *Hind*III restrikciós enzimekkel kivágott 661 bp citomegalovírus (CMV) promótert, a luciferázt kódoló génhez képest upstream a pGL bázis vektor (Promega Corp., Madison, WI) *Mlu*I és *Hind*III restrikciós hasítási helyeire klónozva. Ezt a plazmidot standard molekuláris biológiai technikák alkalmazásával állítottuk össze.

A pXL2727-1 és pXL2727-2 plazmidokat a következő módon állítottuk össze:

2 µg pXL2621 plazmidot *Bam*HI-gyel linearizáltunk; az enzimet inaktiváltuk 10 perces 65 °C-on tartással; ezalatt az idő alatt a 6006 és 6008 oligonukleotidokat hibridizáltuk a pXL2563 plazmid összeállításánál leírtak szerint.

6006: 5'-GATCT(GAA)₁₇CTGCAGATCT-3' (20. számú szekvencia)

6008: 5'-GATCAGATCTGCAG(TTC)₁₇A-3' (21. számú szekvencia).

Ezt a hibridizációs keveréket klónoztuk a pXL2621 plazmid *Bam*HI végeire és DH5α törzsbe történt transzformációt követően rekombináns klónokat azonosítottunk *Pst*I restrikciós enzimes

analízissal, mivel az oligonukleotidok *Pst*I helyet vittek be. Két klónt választottunk ki és a klónozott fragmentum nukleotid-szekvenciáját a 6282 primer (5'-ACAGTCATAAGTGC GGCGACG-3'; 22. számú szekvencia), mint szekvenáló reakció primer segítségével igazoltuk [Viera and Messing, *Gene* 19, 259-268 (1982)]. A pUC plazmidok M13mp7-ből származó rendszerek inszerciós mutagenézishez és szintetikus univerzális primerekkel történő szekvenálásához.

Az első klón (pXL2727-1) 10-szeres ismétlésben tartalmazza a GAA szekvenciát. A második (pXL2727-2) az 5'-GAAGAAGAG(GAA)₇GGAAGAGAA-3' (23. számú szekvencia) szekvenciát tartalmazza.

8.2. Az oszlopok elkészítése és tisztítás

Az 1. példában leírtak szerinti oszlop, amely az 5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (1. számú szekvencia) szekvenciájú oligonukleotidhoz kapcsolódik.

A pXL2727-1 plazmid a GAA szekvencia 14-szeres ismétlését hordozza. A fent leírt oligonukleotid, amely a megfelelő hibridizációs szekvencia CTT 7-szeres ismétlését tartalmazza, ennél fogva képes hibridizálni a plazmiddal 8 különböző pozícióban. Ezzel szemben a pXL2727-2 plazmid ugyanolyan hosszúságú hibridizációs szekvenciával rendelkezik (GAA)₇ (36. számú szekvencia), mint az oszlophoz kapcsolt oligonukleotid. Ez az oligonukleotid ennél fogva csak egy pozícióban képes hibridizálni pXL2727-2-vel. A kísérlet megegyezik a 2. példában leírtakkal, a következő pufferekkel:

F puffer: 2 M NaCl, 0,2 M acetát, pH 4,5

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

A tisztítás hozama pXL2727-1 plazmid esetében 29% és pXL2727-2 esetében 19%.

8.3. Emlős sejtek in vitro transzfekciója

A felhasznált sejtek NIH 3T3 sejtek, amelyeket a kísérlet előtt egy nappal inokulálunk 24 üregű tenyésztő lemezekre 50000 sejt/üreg koncentrációban. A plazmidot 150 mM NaCl-ban hígítjuk és összekeverjük a lipofectant RPR115335-tel. Lipofectant pozitív töltések/DNS negatív töltések alkalmazott aránya 6. A keveréket összerázzuk, 10 percre szobahőmérsékleten állni hagyjuk, hígítjuk borjúmagzat szérumtól mentes tápközegben és azután a sejtekhez adjuk üregenként 1µg DNS arányban. Két órás 37 °C-on tartás elteltével 10 térfogat% borjúmagzat szérumot adunk hozzá és a sejteket 48 órán át inkubáljuk 37 °C-on, 5% CO₂ jelenlétében. A sejteket kétszer mossuk PBS-ben és mérjük a luciferáz aktivitást az előírás szerint (Promega kit, Promega Corp., Madison, WI) Lumat LB9501 luminométerrel (EG and G Berthold, Evry). A 8.2. példában leírtak szerint tisztított pXL2727-1 plazmid kétszer olyan nagy transzfekciós hozamot eredményez, mint ugyanennek a plazmidnak a Wizard Megaprep kit (Promega Corp., Madison, WI) alkalmazásával tisztított változata.

9. példa

pCOR-származék plazmidok tisztítása

A következő példa szemlélteti pCOR-származék plazmidok tisztítását tripla hélix affinitás kromatográfiával. Már bemutattuk, hogy ez a technológia olyan szintig távolít el nukleinsav szennyezőket (főleg gazdaszervezetből származó genomiális DNS-t és RNS-t), amelyet nem tudtunk elérni hagyományos kromatográfiás módszerekkel.

módszerekkel.

Triplex affinitás gélt szintetizáltunk Sephacryl S-1000 SF-fel (Amersham-Pharmacia Biotech), mint kromatográfiás mátrixszal. Először Sephacryl S-1000-t aktiváltuk nátrium-metaperjodáttal (3 mM, szobahőmérsékleten 1 órán keresztül) 0,2 M nátrium-acetátban (pH 4,7). Ezután az oligonukleotidot 5'-végi aminocsoportján keresztül hozzákapcsoltuk az aktivált mátrix aldehid csoportjához redukív aminálással aszkorbinsav (5 mM) jelenlétében a korábban fehérjék kapcsolására leírtak szerint [Hornsey et al., J. Immunol. Methods 93, 83-88 (1986)]. Az ezekhez a kísérletekhez felhasznált homopirimidin oligonukleotid olyan szekvenciával rendelkezett, amely komplementer volt a pCOR plazmid replikációs origójában (ori γ) jelen levő rövid, 14-tagú homopurin szekvenciával (5'-AAGAAAAAAAAAGAA-3') (29. számú szekvencia) [Soubrier et al., Gene Therapy 6, 1482-1488 (1999)]. A fentiek szerint a homopirimidin oligonukleotid szekvenciája 5'-TTCTTTTTTTCTT-3' (30. számú szekvencia).

A következő plazmidokat kromatografáltuk: pXL3296 (pCOR transzgén nélkül, 2,0 kbp), pXL3179 (pCOR-FGF, 2,4 kbp), pXL3579 (pCOR-VEGFB, 2,5 kbp), pXL3678 (pCOR-AFP, 3,7 kbp), pXL3227 (pCOR-lacZ, 5,4 kbp) és pXL3397 (pCOR-Bdeleted FVIII, 6,6 kbp). Ezen plazmidok mindegyikét két anioncserélő kromatográfiás lépéssel tisztítottuk a 4. példában leírtak szerint kapott tisztalizátumokból. ColE1-ből származó pBKS+ plazmidot (pBluescript II KS+, Stratagene), amelyet ultracentrifugálással tisztítottunk CsCl-ben, szintén tanulmányoztuk. A felhasznált plazmidok mindegyike szupercsavarodott (> 95%) topológiai állapotban volt.

Minden egyes plazmid DNS tisztítási kísérletben 300 µg plazmid DNS-t 6 ml 2 M NaCl, 0,2 M kálium-acetát (pH 5,0) keverékében 30 cm/óra áramlási sebességgel vittünk fel a fent említett oligonukleotidot (5'-TTCTTTTTTTCTT-3' (30. számú szekvencia)) tartalmazó affinitás oszlopra. Az oszlopnak ugyanezen puffer 5 térfogatával történt lemosása után a megkötődött plazmidot 1 M Tris-HCl, 0,5 mM EDTA (pH 9,0) elegyével eluáltuk és UV-vel (260 nm) és ioncserélő kromatográfiával Millipore Gen-Pak oszlopon mennyiségileg meghatároztuk [Marquet et al., BioPharm 8, 26-37 (1995)]. Plazmid visszanyerések az összegyűjtött frakcióban a következők voltak: 207 µg pXL3296, 196 µg pXL3179, 192 µg pXL3579, 139 µg pXL3678, 97 µg pXL3227 és 79 µg pXL3397.

Nem tudtunk plazmid kötődést kimutatni (< 3 µg), amikor pKBS+ plazmidot kromatografáltuk ezen az oszlopon. Ez azt mutatja, hogy az 5'-TTCTTTTTTTCTT-3' (30. számú szekvencia) szekvenciájú oligonukleotid stabil triplex szerkezetet alakít ki a pCOR-ben (oriγ) jelen levő komplementer 14-tagú 5'-AAGAAAAAAGAA-3' (29. számú szekvencia) szekvenciával, a pBKS-ben jelen levő, ezzel szorosan rokon 5'-AGAAAAAAGGA-3' (27. számú szekvencia) szekvenciával viszont nem. Ez azt jelzi, hogy egyedi nem-kanonikus triád (ebben az esetben T*GC) bevezetése a triplex szerkezet teljes destabilizációját eredményezi.

Kontrollként, plazmid kötést nem tapasztaltunk (< 1 µg), amikor pXL3179 plazmidot kromatografáltuk vak oszlopon, amelyet szigorúan hasonló körülmények között szintetizáltunk, de oligonukleotid nélkül.

Ezt az affinitás tisztító oszlopot az itt leírt körülmények

között működtetve, a szennyező gazdaszervezet genomiális DNS szintje 2,6%-ról 0,07%-ra csökkent pXL3296 esetében. Ehhez hasonlóan a szennyező gazda DNS 0,5%-ról 0,008%-ra csökkent pXL3179 tisztításakor, amikor a mintát ugyanazon az affinitás oszlopon kromatografáltuk. Továbbá a szennyező RNS szintje nagymértékben csökkent, 43%-ról 0,2% RNS-re pXL3179 preparálásakor ezt az affinitás oszlopot használva.

Ezenkívül a pXL3579 plazmid visszanyerése kisebb volt 8%-nál, amikor az 5'-TTCTTTTTTTCTT-3' (30. számú szekvencia) oligonukleotidot az 5'-TTTTTTTCTT-3' (31. számú szekvencia) oligonukleotidra cseréltük az affinitás oszlopon. Jóllehet a 31. számú szekvenciával rendelkező oligonukleotid komplementer a pXL3579 plazmidban jelen levő VEGFB szekvencia egy részével (azaz a 379-389. nukleotidok ATG-re vonatkozóan), nem jön létre számottevő triplex affinitás. Ez azt jelzi, hogy ehhez az affinitás tisztításhoz nem véletlenszerű homopurin-homopirimidin DNS szekvencia szükséges.

10. példa

ColE1-származék plazmid tisztítása

A következő példa mutatja ColE1-származék plazmidok tisztítását tripla hélix affinitás kromatográfia alkalmazásával. Már bemutattuk, hogy ez a technológia olyan szintig távolít el nukleinsav szennyezőket (főleg gazdaszervezetből származó genomiális DNS-t és RNS-t), amelyet nem tudtunk elérni hagyományos kromatográfiás módszerekkel.

Triplex affinitás gélt szintetizáltunk az 5'-TCTTTTTTTCCT-3' (28. számú szekvencia) oligonukleotidnak perjodáttal oxidált

Sephacryl S-1000 SF oszlophoz történő hozzákaptcsolásával a 9. példában leírtak szerint.

A pXL3296 (pCOR transzgén nélkül) és a ColE1-származék pBKS plazmidot kromatografáltuk az 5'-TCTTTTTTTCCT-3' (28. számú szekvencia) oligonukleotidot a 9. példában leírt körülmények között tartalmazó 1 ml-es oszlopon. Az összegyűjtött frakcióban a plazmidok visszanyerése a következők szerint alakult: 175 µg pBKS és < 1 µg pXL3296. Ez azt jelzi, hogy az 5'-TCTTTTTTTCCT-3' (28. számú szekvencia) oligo-nukleotid stabil triplex szerkezetet alakít ki a pBKS-ben jelen levő komplementer, 12-tagú szekvenciával (5'-AGAAAAAAGGA-3'; 27. számú szekvencia), a pCOR-ben jelen levő, ezzel szorosan rokon 12-tagú 5'-AGAAAAAAGA-3' (32. számú szekvencia) szekvenciával viszont nem. Ez azt jelzi, hogy egyedi nem-kanonikus triád (ebben az esetben C*AT) bevezetése a triplex szerkezet teljes destabilizációját eredményezi.

11. példa

A következő példa szupercsavarodott kettős-szálú DNS molekula, úgymint pXL3296 tisztítását mutatja be tripla hélix affinitással olyan oldatból, amely egy másik szupercsavarodott kettős-szálú molekulát, úgymint pBSK-t tartalmaz. Mindkét kettős-szálú DNS molekula hasonló méretű, de mindegyik DNS molekula tartalmaz olyan egyedi szekvenciát, amely különböző célszekvenciával tripla hélix kialakítására képes. Az előzőekben már leírtak szerint az olyan molekula, mint pXL3296 tartalmazza az 5'-AAGAAAAAAGAA-3' (29. számú szekvencia) szekvenciát, de nem tartalmazza az 5'-AGAAAAAAGGA-3' (27. számú szekvencia) szekvenciát. Ezzel ellentétben olyan molekulák, mint pBKS, tartalmazzák a 27. számú

szekvenciát, a 29. számú szekvenciát viszont nem.

Első lépésben a pXL3296 és pBSK plazmidokat tartalmazó keveréket felvittük az első affinitás oszlopra, amely az 5'-TCTTTTTTTCCT-3' (28. számú szekvencia) oligonukleotidot tartalmazta, úgymint a 10. példában leírt oszlop. Az oldatot átvezettük az első oszlopon, amely tartalmazott meg nem kötődött DNS molekulákat. A második lépésben az első lépés során meg nem kötődött DNS molekulákat vittük fel egy második affinitás oszlopra, amely az 5'-TTCTTTTTTTTCTT-3' (30. számú szekvencia) oligonukleotidot tartalmazta, úgymint a 9. példában leírt oszlop. Ezután mostuk a második oszlopot és a megkötődött molekulákat eluáltuk a második oszlopról a 9. példában leírtak szerint. Csak pXL3296 molekulák eluáltak a második oszlopról, pBSK molekulákat nem mutattunk ki a második oszlop eluátumából (azaz abból az oldatból, amely lejött az oszlopról).

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás kettős-szálú DNS tisztítására a kettős-szálú DNS-t egyéb komponensekkel keverten tartalmazó oldatból, azzal jellemezve, hogy tartalmazza az oldat átvezetését olyan oligonukleotiddal kovalensen kapcsolt oszlopon, amely a kettős-szálú DNS-ben jelen levő specifikus szekvenciával hibridizáció révén a kettős-szálú DNS-sel tripla hélix kialakítására képes, ahol a kovalensen kapcsolódó oligonukleotid tartalmazza az **5'-TCTTTTTTTCCT-3'** (28. számú szekvencia) vagy az **5'-TTCTTTTTTTTCTT-3'** (30. számú szekvencia) szekvenciát.

2. Eljárás kettős-szálú DNS tisztítására a kettős-szálú DNS-t egyéb komponensekkel keverten tartalmazó oldatból, azzal jellemezve, hogy tartalmazza az oldat átvezetését olyan oligonukleotiddal kovalensen kapcsolt oszlopon, amely a kettős-szálú DNS-ben jelen levő specifikus szekvenciával hibridizáció révén a kettős-szálú DNS-sel tripla hélix kialakítására képes, ahol a kettős-szálú DNS-ben jelen levő specifikus szekvencia tartalmazza az **5'-AGAAAAAAGGA-3'** (27. számú szekvencia) vagy **5'-AAGAAAAAAGAA-3'** (29. számú szekvencia) szekvenciát.

3. Eljárás első kettős-szálú DNS tisztítására az első kettős-szálú DNS-t és egy második kettős-szálú DNS-t tartalmazó oldatból, azzal jellemezve, hogy tartalmazza (i) az oldat átvezetését olyan első oszlopon, amely nevezett második kettős-szálú DNS-sel — a benne levő specifikus szekvenciával történő hibridizáció révén — tripla hélix kialakítására képes, kovalensen kötött oligonukleotidot tartalmaz, (ii) az első oszlopon átveze-

tett oldat visszanyerését és (iii) a visszanyert oldat átvezetését olyan második oszlopon, amely nevezett első kettős-szálú DNS-sel — a benne levő specifikus szekvenciával történő hibridizáció révén — tripla hélix kialakítására képes, kovalensen kötött oligonukleotidot tartalmaz, ahol a nevezett első kettős-szálú DNS-ben jelen levő specifikus szekvencia tartalmazza az **5'-AAGAAAAAAAGAA-3'** (29. számú szekvencia) szekvenciát és a nevezett második kettős-szálú DNS-ben jelen levő specifikus szekvencia tartalmazza az **5'-AGAAAAAAAGGA-3'** (27. számú szekvencia) szekvenciát.

4. Eljárás első kettős-szálú DNS tisztítására az első kettős-szálú DNS-t és egy második kettős-szálú DNS-t tartalmazó oldatból, azzal jellemezve, hogy tartalmazza (i) az oldat átvezetését olyan első oszlopon, amely nevezett második kettős-szálú DNS-sel — a benne levő specifikus szekvenciával történő hibridizáció révén — tripla hélix kialakítására képes, kovalensen kötött oligonukleotidot tartalmaz, (ii) az első oszlopon átvezetett oldat visszanyerését és (iii) a visszanyert oldat átvezetését olyan második oszlopon, amely nevezett első kettős-szálú DNS-sel — a benne levő specifikus szekvenciával történő hibridizáció révén — tripla hélix kialakítására képes, kovalensen kötött oligonukleotidot tartalmaz, ahol a nevezett első kettős-szálú DNS-sel tripla hélix kialakítására képes oligonukleotid tartalmazza az **5'-TTCTTTTTTTTCTT-3'** (30. számú szekvencia) szekvenciát és a nevezett második kettős-szálú DNS-sel tripla hélix kialakítására képes oligonukleotid tartalmazza az **5'-TCTTTTTTTCCT-3'** (28. számú szekvencia) szekvenciát.

5. Az 1., 2., 3. vagy 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az oldat sejtlizátum.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a sejtlizátum tiszta lizátum.

7. Az 1., 2., 3. vagy 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kettős-szálú DNS előzetesen tisztított.

8. Az 1., 2., 3. vagy 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a specifikus szekvenciát mesterségesen vezettük be a kettős-szálú DNS-be.

9. Az 1., 2., 3. vagy 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a specifikus szekvencia természetes körülmények között jelen van a kettős-szálú DNS-ben.

10. Az 1., 2., 3. vagy 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az oligonukleotid diszulfid, tioéter, észter, amid vagy amin kötéssel kapcsolódik az oszlophoz.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az oligonukleotid $(CH_2)_n$ szénláncot tartalmazó karral kapcsolódik az oszlophoz, ahol n 1-18 közé eső szám és ahol a kar az oligonukleotidhoz foszfát kötéssel, az oszlophoz pedig amid kötésen keresztül kapcsolódik.

12. Az 1., 2., 3. vagy 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nukleotid legalább egy kémiai módosítással rendelkezik, amely nukleázokkal szemben rezisztenssé teszi vagy megvédi, vagy növeli a specifikus szekvenciához való affinitását.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az oligonukleotidnak legalább egy citozinja metilezett.

14. Az 1., 2., 3. vagy 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kettős-szálú DNS cirkuláris DNS.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a cirkuláris DNS plazmid.

16. Az 1., 2., 3. vagy 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kettős-szálú DNS-ben jelen levő specifikus szekvencia számos pozíciót tartalmaz az oligonukleotiddal történő hibridizációhoz.

17. Az 1., 2., 3. vagy 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hordozó funkciós kromatográfiás oszlop, funkciós műanyag felület vagy funkciós latex gyöngy.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hordozó funkciós kromatográfiás oszlop.

19. A 18. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a tisztított kettős-szálú DNS kromoszómális DNS tartalma 0,5% vagy ennél kevesebb.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a tisztított kettős-szálú DNS kromoszómális DNS tartalma 0,01% vagy ennél kevesebb.

21. Eljárás kettős-szálú RNS tisztítására a kettős-szálú RNS-t egyéb komponensekkel keverten tartalmazó oldatból, azzal jellemezve, hogy tartalmazza az oldat átvezetését olyan oligonukleotiddal kovalensen kapcsolt oszlopon, amely a kettős-szálú RNS-ben jelen levő specifikus szekvenciával hibridizáció révén a kettős-szálú RNS-sel tripla hélix kialakítására képes, ahol a kovalensen kapcsolódó oligonukleotid tartalmazza az 5'-TCTTTTTTTCCT-3' (28. számú szekvencia) vagy az 5'-TTCTTTTTTTCTT-3' (30. számú

szekvencia) szekvenciát.

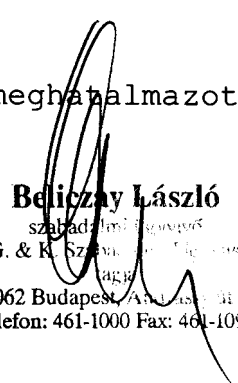
22. Az 1. vagy 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kovalensen kapcsolt oligonukleotid tartalmazza az 5'-TCTTTTTTTCCT-3' (28. számú szekvencia) szekvenciát.

23. Az 1. vagy 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kovalensen kapcsolt oligonukleotid tartalmazza az 5'-TTCTTTTTTTTCTT-3' (30. számú szekvencia) szekvenciát.

24. A 2. vagy 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kettős-szálú DNS-ben jelen levő specifikus szekvencia tartalmazza az 5'-AGAAAAAAGGA-3' (27. számú szekvencia) szekvenciát.

25. A 2. vagy 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kettős-szálú DNS-ben jelen levő specifikus szekvencia tartalmazza az 5'-AAGAAAAAAAAGAA-3' (29. számú szekvencia) szekvenciát.

A meghatalmazott:


Beliczky László
szabadalmazási ügyvéd
az S.B.G. & K. Széchenyi Utcai Irodaház tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

41 oldal
8 old. melléklet
49 oldal
Jelen

SZEKVENCIÁK JEGYZÉKE
SEQUENCE LISTING

- <110> AVENTIS PHARMA S.A.
CROUZET, Joel
SCHERMAN, Daniel
WILS, Pierre
CAMERON, Beatrice
BLANCHE, Francis
- <120> PURIFICATION OF A TRIPLE HELIX FORMATION WITH AN IMMOBILIZED OLIGONUCLEOTIDE
- <130> 3804.1381304
- <140>
<141>
- <150> 09/580,923
<151> 2000-05-26
- <160> 36
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
<211> 25
<212> DNA
<213> Mesterséges szekvencia
- <220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:
szintetikus oligonukleotid
- <400> 1
gaggcttctt cttctttcttc ttctt 25
- <210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Mesterséges szekvencia
- <220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:
szintetikus oligonukleotid
- <400> 2
cttcccgaag ggagaaagg 19

<210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>
 <223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<400> 3
 gaagggcttc cctctttcc 19

<210> 4
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>
 <223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<400> 4
 gaaaaaggaa gag 13

<210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>
 <223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<400> 5
 aagggaggga ggagaggaa 19

<210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>
 <223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<400> 6
 aaggagagga gggagggaa 19

<210> 7
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>
 <223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<400> 7
 ttggtgtggt ggggtgggtt 19

<210> 8
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>
 <223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<400> 8
 aaaaaaggga ataaggg 17

<210> 9
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>
 <223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<400> 9
 gatccgaaga agaagaagaa gaagaagaag aagaagaaga agaagaagaa gaagaagg 58

<210> 10
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>
 <223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<400> 10
 aattccttct tcttcttctt cttcttcttc ttcttcttct tcttcttctt cttcttctg 58

<210> 11
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>
 <223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<400> 11
 tgaccggcag caaaatg

17

<210> 12
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>
 <223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<220>
 <223> a szekvenciában az összes citozin (C) metilezve van

<400> 12
 gaggcttctt cttcttcctc ttctt

25

<210> 13
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>
 <223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<400> 13
 gatccgagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagaggg 58

<210> 14
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>
 <223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<400> 14
aattccctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctcg 58

<210> 15
<211> 58
<212> DNA
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:
szintetikus oligonukleotid

<400> 15
gatccggagg aggaggagga ggaggaggag gaggaggagg aggaggagga ggaggagg 58

<210> 16
<211> 58
<212> DNA
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:
szintetikus oligonukleotid

<400> 16
aattcctcct cctcctcctc ctctcctcc tctcctcct cctcctcctc ctctccg 58

<210> 17
<211> 50
<212> DNA
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:
szintetikus oligonukleotid

<400> 17
ggaggaggagg aggaggagga ggaggaggag gaggaggagg aggaggagga 50

<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:
szintetikus oligonukleotid

<400> 18
aatgcctcct cctcctcctc ctcct 25

<210> 19
<211> 26
<212> DNA
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:
szintetikus oligonukleotid

<400> 19
agtgcctcct ctctctctct ctctct 26

<210> 20
<211> 66
<212> DNA
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:
szintetikus oligonukleotid

<400> 20
gatctgaaga agaagaagaa gaagaagaag aagaagaaga agaagaagaa gaagaactgc 60
agatct 66

<210> 21
<211> 66
<212> DNA
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:
szintetikus oligonukleotid

<400> 21
gatcagatct gcagttcttc ttcttcttct tcttcttctt cttcttcttc ttcttcttct 60
tcttca 66

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:
szintetikus oligonukleotid

<400> 22

acagtcataa gtgcggcgac g

21

<210> 23

<211> 39

<212> DNA

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:
szintetikus oligonukleotid

<400> 23

gaagaagagg aagaagaaga agaagaagaa ggaagagaa

39

<210> 24

<211> 27

<212> DNA

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:
szintetikus oligonukleotid

<400> 24

ccgaattctg gggaccaaag cagtttc

27

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:
szintetikus oligonukleotid

<400> 25

ccaagcttca ctgttcacga cgggtgt

27

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:
szintetikus oligonukleotid

<400> 26

cttcttcttc ttcttcttct t

21

<210> 27

<211> 12

<212> DNA

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:
szintetikus oligonukleotid

<400> 27

agaaaaaaag ga

12

<210> 28

<211> 12

<212> DNA

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:
szintetikus oligonukleotid

<400> 28

tctttttttc ct

12

<210> 29

<211> 14

<212> DNA

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:
szintetikus oligonukleotid

<400> 29

aagaaaaaaa agaa

14

<210> 30

<211> 14

<212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<400> 30
 ttcttttttt tctt

14

<210> 31
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<400> 31
 ttttttttcc t

11

<210> 32
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<400> 32
 agaaaaaaaa ga

12

<210> 33
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<400> 33
 gaagaagaag aagaagaaga agaagaagaa gaagaagaag aagaagaaga a

51

<210> 34
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>
 <223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<400> 34
 ggaggaggag gaggaggagg aggaggagga ggaggaggag gaggagga 48

<210> 35
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>
 <223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<400> 35
 gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga 50

<210> 36
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>
 <223> A mesterséges szekvencia leírása:
 szintetikus oligonukleotid

<400> 36
 gaagaagaag aagaagaaga a 21