



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 222 417**

⑤ Int. Cl.⁷: **C12N 15/10**
C12N 15/68

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **02008545 .2**

⑧⑥ Fecha de presentación: **16.04.2002**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1251168**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **23.10.2002**

⑤④ Título: **Método para mejorar la estabilidad del ADN lineal en sistemas de transcripción/traducción *in vitro*, exentos de células.**

③⑩ Prioridad: **18.04.2001 DE 101 19 006**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2005

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2005

⑦③ Titular/es: **Roche Diagnostics GmbH**
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, DE
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.

⑦② Inventor/es: **Watzele, Manfred;**
Hoffmann, Thomas;
Nemetz, Cordula;
Heindl, Dieter;
Metzler, Thomas y
Mutter, Wolfgang

⑦④ Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 222 417 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para mejorar la estabilidad del ADN lineal en sistemas de transcripción/traducción *in vitro*, exentos de células.

La presente invención se refiere a un método para mejorar la estabilidad del ADN lineal corto, frente a las exonucleasas en sistemas de transcripción/traducción *in vitro*, exentos de células, empleando lisados que contienen exonucleasas o en sistemas celulares en donde la estabilidad del ADN lineal corto se mejora añadiendo ADN lineal inespecífico.

La transcripción/traducción *in vitro*, dependiente del ADN, exento de células, trabaja completamente bien en la práctica con respecto a la expresión del ADN circular de doble hélice y con respecto a la expresión del ADN lineal largo. Las tentativas de una expresión de fragmentos de ADN lineal más corto ha tenido únicamente un éxito limitado. Cuanto más pequeño es el ADN empleado más difícil ha sido obtener apreciables cantidades de producto génico. Se estableció que estas dificultades eran debidas a la presencia de exonucleasas. Por lo tanto se demostró que la exonucleasa V es responsable de la degradación del ADN lineal cuando los lisados S30 de *E. coli* fueron transcritos y traducidos *in vitro*. La exonucleasa V se compone de tres subunidades (los productos génicos recB, recC, recD). Esta exonucleasa escinde el ADN lineal a partir de su extremo 3'.

Se intentó remediar este problema mediante la mutación de las subunidades de esta exonucleasa con el fin de eliminar la actividad lítica. Yang *et al.*, (1980) PNAS vol. 77, n° 12 pp 7029-7033 describen una síntesis mejorada de proteína partiendo de moldes de ADN lineal empleando la cepa de *E. coli* CF300 después de la delección de la exonucleasa V (eliminación de los genes recB, recC, de la cepa recB21).

Leavel Basset *et al.*, (1983), J. Bacteriol. vol. 156, n° 3, pp. 1359-1362, mutaron adicionalmente los genes de la RNasa y polinucleótido fosforilasa (rna-19 pnp-7) en la cepa recB21 (cepa CLB7) y lograron una expresión de la proteína significativamente mayor con moldes de ADN lineal después de un período de una hora de incubación.

Lesley *et al.*, (1991), J. Biol. Chem. vol. 266, n° 4, pp 2632-2638, emplea una cepa recD BL21 deficiente en exonucleasa V, a la cual ha dado el nombre de cepa SL119, y describe por primera vez el método de síntesis de la proteína *in vitro* partiendo de moldes generados por PCR. Se dispone comercialmente de lisados de la cepa SL 119 (Promega) para la transcripción/traducción *in vitro* empleando moldes lineales.

Sin embargo, una desventaja de las medidas descritas más arriba es que todos estos mutantes crecen muy despacio y también que los lisados obtenidos de estas cepas tienen una velocidad de síntesis significativamente más pobre. Aparentemente esta exonucleasa juega un importante papel en el metabolismo de las bacterias. Por lo tanto, parece ser importante emplear lisados o cultivos celulares en los cuales la exonucleasa esté presente.

Otra medida concebible para proteger no obstante los ácidos nucleicos contra la degradación exonucleolítica, es el modificar los ácidos nucleicos bien sea protegiendo ambos extremos, o bien sea empleando bloques de construcción nucleotídica modificados, como se describe en la literatura para ácidos nucleicos en el campo anti-sentido y en las siguientes citas:

Las moléculas de ADN/ARN monocatenarias pueden protegerse protegiendo los extremos con grupos alquilo y modificando las bases. Pandolfi *et al.* (1999) Nucleosides & Nucleotides, 18(9), 2051-2069. Verheijen *et al.*, (2000) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 10, 801-804, muestran una mayor estabilidad de las moléculas de ADN monocatenarias protegiendo los extremos con enlaces 4-hidroxi-N-acetilprolinol, L-serinol ó mediante 3'-3'-fosfodiéster. Los enlaces fosforotioato puros o mixtos y oligonucleótidos químicamente modificados p. ej., metilfosfonatos y fosforamidatos son más estables y se degradan más lentamente por las exonucleasas Kandimalla *et al.*, NAR (1997) vol 25, n° 2, pp. 370-378. Tohda *et al.*, (1994) Journal of Biotechnology ("Revista de Biotecnología") 34 (1994) 61-69 muestran que el ARN que contiene fosforotioatos es más estable frente a las nucleasas y por lo tanto tiene una mayor eficiencia de traducción. Sin embargo, por regla general solamente podrían producirse pequeñas cantidades de proteína. Tang *et al.*, (1993) NAR, vol. 21 n° 11 pp 2279-2735 muestran que las estructuras de bucle en horquilla protegen el extremo 3' de los ADN monocatenarios contra la degradación exonucleolítica. Hirao *et al.*, (1993) FEBS, vol. 321, n° 2,3,169-172 muestran que la horquilla que forma el fragmento d de ADN (GCGAAGC), es extremadamente resistente a las nucleasas de los extractos de *E. coli*. Yoshizawa *et al.*, (1994) NAR, vol. 22 n° 12 pp. 2217-2221 describen que una estabilización del extremo 3' de ARNm por hibridación con la misma horquilla da como resultado un aumento de 200 veces la eficiencia de la traducción *in vitro* con extractos de *E. coli*. Good y Nielsen (1998) PNAS USA 95, 2073-6 muestran que las moléculas sintéticas que contienen bases que están acopladas a un esqueleto de péptidos (ácido péptido nucleico, PNA) son resistentes a la escisión hidrolítica en extractos de *E. coli* y pueden ser empleados como molécula sin sentido. Burdick y Emlen (1985), J. Immunology 135, 2593-7 describen que en inmunocomplejos ADN anti-ADN, las moléculas de IgG pueden proteger el ADN que está unido a la misma, de la degradación nucleolítica. La patente EP 0 967 274 A2 describe métodos para la preparación de moléculas de ADN lineal de doble cadena en forma de pesa. En este método se escinde un plásmido con enzimas de restricción y las moléculas resultantes de doble cadena cerradas no covalentemente, se modifican a continuación para formar construcciones en forma de pesa mediante la digestión de los extremos con una endonucleasa de restricción que forma colgantes monocatenarios y a continuación ligando los oligómeros en forma de horquilla emparejados, sobre los colgantes monocatenarios resultantes. Esta construcción tiene una mayor estabilidad frente a las exonucleasas de la T7 ADN polimerasa.

Una desventaja de estas medidas es que la síntesis de estos bloques de construcción de nucleótidos modificados, es a menudo muy complicada. Por una parte, la preparación de los nucleótidos modificados es complicada y cara. Por otro lado, se necesitan unos pasos del procedimiento que consumen un tiempo adicional, para incorporar la modificación. Además, pueden surgir dificultades empleando los ácidos nucleicos modificados como moldes. En el caso de los fosfotioatos una desventaja es por ejemplo que la síntesis es muy complicada y se forma una mezcla de diastereómeros, la cual, después de la incorpora-

ción, no es óptimamente adecuada como molde para la transcripción o la traducción.

Otros sistemas de expresión exentos de células sin estrategias de protección están descritas en la técnica anterior: En la patente US 5571690, Hecht describe un método para la síntesis exenta de células de una proteína, partiendo de un molde que ha sido generado en una reacción PCR. En este método, se amplifica la secuencia completa de genes incluyendo la región promotora del fago de un plásmido. Después, en una transcripción *in vitro*, se emplea un lisado de reticulocitos de conejo para la traducción. Con este método ha sido posible producir 57 µg/ml de una proteína empleando ARNm que ha sido modificado después de la transcripción con un 5'CAP. Martemyanov *et al.*, (1997) FEBS Lett. 414, 268-270 emplean un extracto S30 de *E. coli* para la síntesis exenta de células de una proteína partiendo de un molde el cual ha sido generado en una reacción PCR de 2 pasos. En este método el gen diana se amplifica en primer lugar en una reacción PCR con ayuda de dos cebadores oligonucleótidos gen-específicos y a continuación se someten a una segunda reacción PCR en la cual se emplea un llamado megacebador para fusionar el promotor T7 y el sitio de unión ribosómica con el gen amplificado. Sólo fué posible producir cantidades radioactivamente detectables de proteína. Yang y col., (2000), J. Bacteriol. 182, 295-302 emplean un extracto de *E. coli* para demostrar la síntesis exenta de células de una proteína que parte de un molde que ha sido generado en una reacción PCR. En este método fue solamente posible producir cantidades de proteína radioactivamente detectables. Nakano *et al.*, (1999) Biotechnol & Bioeng. 64, 194-199 emplean un extracto S30 de *E. coli* en un reactor de fibra hueca para producir por lo menos 80 µg/ml de proteína en la mezcla de reacción partiendo de un molde generado en una reacción PCR. En la patente US 6027913, Sommer empleó un extracto de reticulocitos para la síntesis exenta de células de una proteína partiendo de un molde generado en una reacción PCR de un único paso. En este método el promotor T7 y el sitio de unión ribosómica se fusionan al gen diana. Incluso con este método pueden producirse solamente pequeñas cantidades de proteína.

Sin embargo, los métodos descritos más arriba no son satisfactorios. Aunque los lisados eucarióticos de reticulocitos de conejo están relativamente exentos de nucleasas, una desventaja es que estos lisados no pueden producirse económicamente en grandes cantidades. Permiten solamente muy pequeños rendimientos en proteínas. Lo mismo puede aplicarse a los lisados de germen de trigo, los cuales o bien deben ser preparados muy laboriosamente o bien de otra manera están fuertemente contaminados con factores de inhibición de la traducción del tejido circundante (patente JP 236 896).

En cambio, los lisados de *E. coli* suministran cantidades mucho mayores de proteína. Sin embargo, los métodos descritos para la preparación de lisados de *E. coli* permiten solamente períodos de reacción relativamente cortos de hasta aproximadamente una hora con moldes de ADN lineal puesto que más tarde estos moldes de ADN son completamente degradados por las exonucleasas contenidas en el lisado. Los lisados obtenidos a partir de los mutantes de la exonucleasa de *E. coli* (a saber cepas deficientes en exonucleasa) tienen un rendimiento de la síntesis significativamente más pobre en comparación con las cepas de tipo

salvaje tales como la cepa A19 por ejemplo.

Los métodos para la protección del ARNm tienen la desventaja de que en primer lugar, la transcripción *in vitro* tiene que efectuarse antes de que el ARNm protegido pueda ser añadido al lisado. Esto a su vez permite una reacción acoplada y una síntesis continua de ARN. Métodos para la protección del ARN están descritos en Tohda *et al.*, (1994), Journal of Biotechnology 34 (1994), 61-69, Yoshizawa *et al.*, (1994) NAR, vol 22, pp 2217-2221.

Por lo tanto el objeto de la presente invención es un método para mejorar la estabilidad del ADN lineal corto frente a las exonucleasas en sistemas de transcripción/traducción exentos de células, *in vitro*, dependientes de ADN, empleando lisados que contienen exonucleasas, o en sistemas celulares.

Este objeto se ha logrado de acuerdo con la invención mediante un método para mejorar la estabilidad del ADN lineal corto, frente a las exonucleasas en sistemas de transcripción/traducción exentos de células, *in vitro*, dependientes de ADN, empleando lisados que contienen exonucleasas o en sistemas celulares en los que la estabilidad del ADN lineal corto se mejora mediante la adición de ADN lineal inespecífico.

El método de acuerdo con la invención, se emplea de preferencia para sistemas de transcripción/traducción *in vitro*, acoplados. Acoplados, en el sentido de la presente invención, se refiere a que la transcripción y la traducción tienen lugar al mismo tiempo en una reacción. Acoplados, en el sentido de la presente invención, puede también significar que las moléculas de ARNm que acaban de formarse por transcripción son traducidas inmediatamente por los ribosomas.

El método de acuerdo con la invención es particularmente empleado de preferencia para los sistemas de transcripción/ traducción exentos de células, *in vitro*, que emplean lisados que contienen exonucleasas. El método es especialmente empleado para sistemas de transcripción/traducción exentos de células *in vitro*, que emplean lisados que contienen exonucleasas de procariotas, p. ej., lisados de *E. coli*.

La presente invención se refiere también al empleo del método de acuerdo con la invención para sistemas de transcripción/traducción exentos de células, *in vitro*, que emplean lisados de eucariotas que contienen exonucleasas. Estos lisados pueden ser de oocitos o huevos p. ej., de *Xenopus*. Es posible también emplear lisados de gérmenes de trigo o reticulocitos de conejo. El método de acuerdo con la invención, puede emplearse también cuando los lisados que contienen la exonucleasa son lisados de células eucarióticas que se han desarrollado en un cultivo celular.

El empleo de un lisado procariótico es el más preferido de acuerdo con la invención. Sin embargo, el lisado eucariótico corriente de reticulocitos del conejo contiene una cantidad mucho menor de exonucleasas que el del procariota *E. coli* por ejemplo, y por lo tanto debería ser preferido en vistas a la estabilidad de los moldes lineales. Sin embargo, el empleo del lisado procariótico es ventajoso puesto que en contraste a los ribosomas eucarióticos, los ribosomas procarióticos no necesitan una estructura CAP para una alta velocidad de síntesis. Esta estructura CAP no puede a su vez formarse en una reacción de transcripción/traducción acoplada, es decir, una reacción en la que transcripción y traducción se realizan al mismo tiempo.

ADN corto en el sentido de la presente invención significa que solamente hasta 10.000 pares de bases adicionales están presentes antes y después de un gen (es decir un gen incluyendo sus elementos reguladores tales como promotor, terminador, elementos que aumentan la traducción).

Sin embargo, el ADN lineal añadido (ADN sacrificial o competidor) no debería dar por resultado una síntesis de fondo de proteínas, indeseable. Por lo tanto, el ADN añadido debe ser inespecífico. Dentro del sentido de la presente invención, ADN inespecífico significa que el ADN lineal añadido no se transcribe en el sistema de transcripción/ traducción *in vitro* existente.

Varias medidas pueden emplearse para asegurar que el ADN lineal añadido no se transcribe. En los sistemas de transcripción/traducción *in vitro*, que emplean lisados que contienen exonucleasa, se emplean de preferencia ARN-polimerasas las cuales solamente se unen al ADN que hay que expresar o solamente pueden emplear el ADN para ser expresado como un molde para la síntesis del ARN, pero no el ADN inespecífico añadido. Esto se ilustra además mediante el siguiente caso:

Se pretende transcribir ADN procariótico. En este caso es posible emplear una ARN polimerasa procariótica o una ARN polimerasa de bacteriófagos tales como los de los fagos T7, T3 o SP6 como la polimerasa que reconoce el correspondiente promotor procariótico T7, T3 o SP6 pero no los promotores de los sistemas eucarióticos. Por lo tanto, en este caso el ADN eucariótico puede añadirse como ADN inespecífico, Así, solamente se transcribirá el gen después de un promotor procariótico T7, T3 o SP6, pero no el ADN eucariótico añadido, el cual es por lo tanto reconocido como inespecífico para el sistema que se emplea (gen con promotor procariótico T7, T3 o SP6, más promotor procariótico T7, Y3 o SP6).

En casos en donde el ADN sacrificial es ADN eucariótico, es preferible añadir ADN cortado de esperma de arenque, esperma de salmón o timo de ternero.

Así, un método para prevenir la expresión del ADN sacrificial es el de que el ADN añadido sea de una especie extraña, o que no contenga ningún elemento regulador que pudiera ser reconocido por la polimerasa empleada para la expresión.

Otra medida preferida para prevenir la expresión inespecífica para el método de acuerdo con la invención en sistemas de transcripción/traducción *in vitro*, que emplean lisados que contienen exonucleasas, es para inhibir las polimerasas que puedan estar presentes en los lisados o sistemas celulares con el fin de prevenir la expresión inespecífica del ADN añadido o del ADN presente en los sistemas de lisados/celulares.

Es particularmente preferido cuando la transcripción del ADN inespecífico se impide por inhibición de las ARN-polimerasas que dependen del ADN, las cuales transcribirían también el ADN inespecífico. Por lo tanto, si por ejemplo el sistema de traducción *in vitro* es un sistema de transcripción/traducción *in vitro* que emplea lisados que contienen exonucleasa, que están obtenidos a partir de procariotas, tales como los lisados de *E. coli*, el gen que hay que expresar puede ser proporcionado por un promotor como se ha descrito más arriba, el cual es solamente reconocido por una ARN-polimerasa de bacteriófago, tal como la ARN-polimerasa T7, T3 o SP6. A continua-

ción se añade la T7, T3 o SP6 ARN-polimerasa (primera medida para prevenir la expresión inespecífica). Se añade una sustancia tal como la rifampicina como medida adicional la cual inhibe las ARN-polimerasas que dependen del ADN en el lisado de procariotas. Por lo tanto solamente la ARN-polimerasa de bacteriófago tal como la T7, T3 o SP6 ARN-polimerasa es activa, la cual reconoce solamente el promotor del gen que hay que expresar. Estas medidas suprimen en gran manera la expresión inespecífica.

Una medida adicional o alternativa es ayudar con otras sustancias en lugar de la rifampicina tales como la estreptolidigina, tirandamicina, sorangicina o derivados de rifamicina, las cuales inhiben la extensión de la cadena del ARN mediante la unión a las ARN-polimerasas dependientes de ADN de lisados procariotas.

En el caso de sistemas de transcripción/traducción *in vitro* empleando lisados que contienen exonucleasas que son derivados de eucariotas, puede añadirse una sustancia para prevenir la expresión inespecífica que inhibe la ARN-polimerasa II en los lisados eucarióticos p. ej., la alfa-amanitina. A continuación, pueden añadirse polimerasas especiales tales como la T7, T3 ARN-polimerasa o SP6 ARN-polimerasa, la cual solo acepta el gen que hay que expresar como un molde cuando el gen se localiza detrás de un promotor adecuado.

De acuerdo con el método de la invención es preferible añadir ADN inespecífico a una concentración de 1 a 200 $\mu\text{g/ml}$ por mezcla de traducción. Una concentración de 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$ por mezcla de traducción es particularmente preferida.

Además, se prefiere que el ADN inespecífico tenga una longitud de por lo menos 10 pares de bases.

Una ventaja del método de acuerdo con la invención es que los genes no tengan que ser clonados de una manera complicada en un vector plásmido circular con el fin de permitir la síntesis de la proteína, sino que el gen deseado pueda ser directamente amplificado a partir de un banco de genes o una fracción de ARN mediante PCR o RT-PCR para la expresión de una proteína. Las regiones del promotor y del terminador necesarias para la expresión pueden ser insertadas adicionalmente en esta PCR.

Puede también concebirse que este ADN inespecífico se adicione, en la llamada inmunización por ADN, con una construcción lineal de la expresión del ADN. En la inmunización por ADN es corriente inyectar una construcción de la expresión del ADN en el animal, la cual a continuación es extraída y expresada por las células del animal. Hasta que el extracto está dentro de las células la pieza de ADN está expuesta al ataque exonucleolítico y el ADN inespecífico añadido la protegería contra éste.

Las ventajas de la estabilización del ADN de acuerdo con el método de la invención son que el molde puede volver a formar continuamente el ARNm y por lo tanto el proceso de síntesis de la proteína puede tener lugar durante un período más largo en por ejemplo los procesos CFCF y CECF descritos por Spirin *et al.* en las patentes EP 0 312 617, EP 0 401 369. En las técnicas CFCF y CECF citadas por Spirin la traducción/ transcripción *in vitro* es suministrada con nuevos sustratos y los productos de reacción se separan continuamente. La reacción de transcripción/traducción *in vitro* puede así tener lugar durante un período más largo, es decir, hasta varios días. Por lo tanto el molde de ADN tiene que ser protegido du-

rante un período más largo, como sería el caso en una traducción/transcripción *in vitro* corriente, la cual dura desde 30 minutos hasta un máximo de dos horas.

Se ha mostrado como la expresión de una proteína partiendo de un molde lineal podría multiplicarse varias veces, mediante el método de acuerdo con la invención.

La presente invención se refiere también a un kit que consiste en uno o varios recipientes que contienen los siguientes componentes:

- un lisado que contiene ribosomas preparado a partir de células procarióticas o eucarióticas por métodos que son ya conocidos por los expertos en la técnica de producción de lisados para la traducción *in vitro*;
- uno o más de los 20 L-aminoácidos que se encuentran en la naturaleza;
- uno o más ARNt de los que se encuentran en la naturaleza o bien pueden obtenerse por síntesis;
- uno o más nucleótidos de los que se encuentran en la naturaleza, los cuales pueden ser sin fosforilar o estar presentes como monofosfatos, difosfatos o trifosfatos;
- ADN lineal inespecífico.

La presente invención se refiere también a una solución reactivo que contiene:

- un lisado que contiene ribosomas preparado a partir de células procarióticas o eucarióticas por métodos que son ya conocidos por los expertos en la técnica de producción de lisados para la traducción *in vitro*;
- uno o más de los 20 L-aminoácidos que se encuentran en la naturaleza;
- uno o más ARNts de los que se encuentran en la naturaleza o bien pueden obtenerse por síntesis;
- uno o más nucleótidos de los que se encuentran en la naturaleza, los cuales pueden ser sin fosforilar o estar presentes como monofosfatos, difosfatos o trifosfatos;
- ADN lineal inespecífico.

Métodos que son ya conocidos por un experto en la técnica para la producción de lisados para la traducción *in vitro*, se describen por ejemplo en Zubay, G (1973) *Annu. Rev. Genet.* 7, 267 (“Prokariotische Extrakte”) (“Extractos procarióticos”); Clemens M.J. & Pruijn G.J.M. (1999) pp 129-163 en *Protein Expression - A practical Approach* (“Expresión de proteínas - Un método práctico”), Higgins, S.J. & Hames, B.D. eds. Oxford University Press.

Leyendas de las figuras

Figura 1

La figura 1 muestra la mayor estabilidad del ADN (fragmentos de plásmido con un tamaño de 2830 y 1321 pares de bases) en una mezcla acoplada de transcripción/traducción que contiene un lisado de *E. coli* S30 en presencia de ADN cortado de esperma de arenque.

Calle 1: M = marcador

Calles 2-7: mezclas de transcripción/traducción *in vitro* con/sin adición de ADN después de 0,2,5,30,60

y 120 minutos de período de incubación.

Calles 8-13: mezclas de transcripción/traducción con adición de 520 $\mu\text{g/ml}$ de ADN cortado de esperma de arenque, en cada caso después de 0, 2, 5, 30, 60 y 120 minutos de período de incubación.

Calle 14: Fragmentos de plásmido que tienen un tamaño de 2830 y 1321 pares de bases antes de la incubación.

Figura 2

La figura 2 muestra una mejora de la velocidad de la síntesis de la proteína específicamente para el ADN lineal del molde mediante la adición de cantidades crecientes de ADN cortado.

Columnas azules: mezclas de transcripción/traducción del gen de la proteína fluorescente verde (GFP) partiendo de ADN lineal (plásmido pIVEX2.1 GFP escindido con EcoRV/SphI), incubado con un lisado de *E. coli*. Se añadieron a las mezclas 0, 1, 2 y 5 μg de ADN de esperma de arenque, cortado, inespecífico.

Columna roja: Mezclas que contienen el plásmido circular sin escindir pIVEX2.1 GFP, al cual se añadieron 0, 1, 2 y 5 μg de ADN de esperma de arenque, cortado, inespecífico.

Figura 3

La figura 3 muestra que la adición de ADN circular inespecífico, en contraste con el ADN inespecífico lineal, no mejora la velocidad de la síntesis de la proteína en una mezcla acoplada de transcripción/traducción que contiene un lisado de *E. coli* S30, a partir de un molde lineal.

Curva roja: adición de 0 a 7 μg de ADN de esperma de arenque cortado inespecífico a las mezclas de transcripción/ traducción del gen de la proteína fluorescente de color verde, a partir de un ADN lineal de molde incubado con un lisado de *E. coli*. Se añadieron 0, 1, 2, y 5 μg de ADN de arenque cortado inespecífico, a las mezclas.

Curva azul: adición de 0 a 7 μg de plásmido circular pBR322 (en lugar de ADN de esperma de arenque cortado) a las mezclas de transcripción/traducción.

Figura 4

La figura 4 muestra una síntesis mejorada de proteína con adición de ADN inespecífico lineal en una mezcla acoplada de transcripción/traducción conteniendo un lisado de *E. coli* S30 a partir de un producto PCR impurificado y purificado.

Por lo tanto, puede verse ya en el producto impurificado de PCR que la síntesis de la proteína es posible en una mezcla acoplada de transcripción/traducción que contiene un lisado de *E. coli* S30 cuando se añade ADN lineal inespecífico.

La columna 1 y 2 del producto de PCR impurificado que contiene una secuencia de codificación para la GFP y los elementos de control promotor T7, sitio de unión ribosómica y terminador T7. Columnas 3 y 4, producto PCR purificado. Columna 5, control positivo: plásmido pIVEX2.1 GFP escindido con EcoRV/SphI, que contiene una secuencia de codificación para GFP y los elementos de control, promotor T7, sitio de unión ribosómica, y terminador T7 se analizaron en la forma purificada e impurificada en la expresión *in vitro*.

Columnas 2 y 4: 0,5 μg del producto PCR más 5 μg de ADN de esperma de arenque cortado inespecífico (HS ADN),

Columnas 1 y 3: 1 μg del producto PCR

Ejemplo 1

Preparación del ADN del molde

El plásmido pIVEX2.1 GFP que contenía la secuencia para la proteína fluorescente verde de la *Aequorea victoria* en forma de un mutante GFPciclo 3 (Nature Biotechnology (1996) 14, 315-319), se escindió durante 2 horas a 37°C en fragmentos de 2830 bp, 1321 bp y 191 bp en una escala preparativa empleando 1,5 U de SphI y EcoRV (Roche Diagnostics GmbH) por μg de ADN. El fragmento de 1321 bp contenía la secuencia que codifica la GFP con los siguientes importantes elementos de control para la expresión *in vitro*: promotor T7, sitio de unión ribosómica y terminador T7.

Se amplificó un fragmento de 1115 bp con el kit Expand High Fidelity PCR (Roche Diagnostics GmbH) para la expresión *in vitro* a partir de fragmentos de PCR. El producto de la PCR empezó 30 bp en dirección hacia arriba del promotor T7 y contenía la secuencia que codifica la GFP hasta el final del terminador T7. Se emplearon los siguientes cebadores para la amplificación: cebador 5' con sentido gcttagatcgagatctcg-atccccgaaattaacgactcactataggagac cacaacggttc, y cebador 5' antisentido ggaagctttcagcaaaaaaccctcaagaccggttagaggcccc aagg. Se emplearon 50 ng de pIVEX2.1 GFP como molde. El ciclo PCR de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 65°C, 1 minuto a 72°C, se repitió 30 veces. La concentración del producto se estimó por medio de un gel de agarosa. El kit High Pure PCR Purification (Roche Diagnostics GmbH) se empleó para purificar el producto PCR.

Se emplearon el ADN de esperma de arenque cortado y el plásmido circular pBR322 de Roche Diagnostics GmbH como competidor inespecífico o ADN sacrificatorio.

Ejemplo 2

Reacción de transcripción/traducción acoplada in vitro

Se efectuaron reacciones de transcripción/traducción en un volumen de 50 μl durante 2 horas a 30°C. La solución de reacción contenía 80,5 mM de acetato de potasio, 10 mM de acetato de magnesio, 35 mM de cloruro de amonio, 4 mM de cloruro de magnesio, 4% de polietilenglicol 2000, 1 mM de ATP, 0,5 mM de CTP, 1 mM de GTP, 0,5 mM de UTP, 30 mM de fosfoenolpiruvato, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de piruvato quinasa, 400 μM de cada aminoácido (todos los 20 aminoácidos que se encuentran en la naturaleza), 0,1 mM de ácido fólico, 0,1 mM de EDTA, 50 mM de HEPES-KOH pH 7,6/30°C, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de rifampicina, 0,03% de azida de sodio, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina, 1 mg/ml de leupeptina, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de pepstatina A, 10 mM de acetilfosfato, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ARNt de *E. coli* MRE600, 8 mM de ditiotreitol, 100 U/ml de inhibidor de Rnasa, 15 μl de lisado de *E. coli*, 0,5 U/ μl de T7-ARN polimerasa. El lisado de *E. coli* se preparó a

partir de la cepa A19 por el método de Zubay (Annu. Rev. Genet. (1973) 7, 267).

Ejemplo 3

Figura 1

5 Se escindió el plásmido pIVEX2.1 GFP en una escala preparativa con 1,5 U de cada una de las SphI y EcoRV por μg de ADN durante 1 hora a 37°C en fragmentos de 2830 bp, 1321 bp y 191 bp. Se incubaron alícuotas de 2 μg de la mezcla de escisión durante 0, 2, 5, 30, 60 y 120 minutos con 26 μg de ADN de esperma de arenque cortado, en un mezcla de 50 μl de transcripción/traducción. Las mismas incubaciones se efectuaron sin la adición de ADN inespecífico cortado. Después de la precipitación con etanol del ADN, se separó en un gel de 1% de agarosa (M, marcador de peso molecular; calle 14, plásmido escindido sin adición de lisado).

Ejemplo 4

Figura 2

15 Se incubó a 30°C el plásmido pIVEX2.1 GFP escindido con EcoRV/SphI, durante 2 horas a 30°C en una mezcla de transcripción/ traducción acoplada que contenía lisado de *E. coli* S30. Se añadieron 0, 1, 2 y 5 μg de ADN de esperma de arenque cortado inespecífico a las mezclas. Las mismas incubaciones se efectuaron con el plásmido pIVEX2.1 GFP sin escindir. Se midió la actividad GFP por medio de espectroscopía de fluorescencia. Para la medición se diluyeron las muestras entre 1:50 y 1:400 según su contenido, con 100 mM de HEPES-KOH pH 7,6/30°C, 14 mM de acetato de magnesio, 60 mM de acetato de potasio, 0,5 mM de ditiotreitol.

Ejemplo 5

Figura 3

20 Se incubó a 30°C el plásmido pIVEX2.1 GFP escindido con EcoRV/SphI, durante 2 horas en una mezcla de transcripción/ traducción acoplada que contenía lisado de *E. coli* S30. Se añadieron de 0 a 7 μg de ADN de esperma de arenque cortado inespecífico o de 0 a 7 μg de plásmido circular pBR322 a las mezclas. Se midió la actividad GFP por medio de espectroscopía de fluorescencia como se ha descrito en la figura 2.

Ejemplo 6

Figura 4

25 Se ensayó el producto de la PCR que contenía la secuencia de codificación del GFP y los elementos de control promotor T7, sitio de unión ribosómica y terminador T7 en la expresión *in vitro* en forma purificada y sin purificar. Se incubaron mezclas que contenían 1 μg de producto de PCR o 0,5 μg de producto PCR más 5 μg de ADN de esperma de arenque cortado inespecífico (HS ADN), durante 2 horas a 30°C en una mezcla de transcripción/traducción acoplada. Se determinó la actividad GFP como se ha descrito en la figura 2 por medio de espectroscopía de fluorescencia.

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para la mejora de la estabilidad del ADN lineal corto frente a las exonucleasas en sistemas de transcripción/traducción *in vitro* exentos de células, empleando exonucleasas que contienen lisados o en sistemas de expresión de proteína celular que contienen exonucleasas en donde la estabilidad del ADN lineal corto se mejora añadiendo ADN lineal que no se transcribe en dicho sistema de transcripción/traducción *in vitro*.

2. Método según se ha reivindicado en la reivindicación 1, en donde el ADN no transcrito en dicho sistema es ADN cortado de esperma de arenque, esperma de salmón o timo de ternera.

3. Método según se ha reivindicado en una de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde el ADN no transcrito en dicho sistema es ADN cortado de esperma de arenque.

4. Método según se ha reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 3 en donde los sistemas de transcripción/traducción *in vitro* exentos de células son sistemas de transcripción/traducción *in vitro* acoplados exentos de células.

5. Método según se ha reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los lisados que contienen las exonucleasas son lisados procarióticos.

6. Método según se ha reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde los lisados que contienen las exonucleasas son lisados de *E. coli*.

7. Método según se ha reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los lisados que contienen las exonucleasas son lisados eucarióticos.

8. Método según se ha reivindicado en la reivindicación 7, en donde los lisados que contienen las exonucleasas son lisados de células eucarióticas que se han desarrollado en un cultivo celular.

9. Método según se ha reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el ADN no transcrito en dicho sistema se añade a una concentración de 1 a 200 $\mu\text{g/ml}$ por mezcla de traducción.

10. Método según se ha reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el ADN no transcrito en dicho sistema se añade a una concentración de 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$ por mezcla de traducción.

11. Método según se ha reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el ADN no transcrito en dicho sistema tiene una longitud de por lo menos 10 bp.

12. Empleo de un método como se ha reivindicado en una de las reivindicaciones 1-11, para expresar una proteína.

13. Empleo del método según se ha reivindicado en una de las reivindicaciones 1-11, para expresar una proteína, en donde el gen deseado se amplifica directamente a partir de un banco de genes o fracción de ARN mediante una PCR o RT-PCR.

14. Empleo del método según se ha reivindicado en una de las reivindicaciones 1-11, para expresar una proteína, en un reactor CFCF y CECF.

15. Kit que consiste en uno o varios recipientes que contienen los siguientes componentes:

- un lisado que contiene ribosomas preparados a partir de células procarióticas o eucarióticas mediante un método para la producción de lisados para la traslación *in vitro*;
- uno o más de los 20 L-aminoácidos que se encuentran en la naturaleza;
- uno o más ARNts de los que se encuentran en la naturaleza o sintéticos;
- uno o más de los nucleótidos que se encuentran en la naturaleza, los cuales pueden estar sin fosforilar o estar presentes como monofosfatos, difosfatos o trifosfatos, y
- ADN lineal el cual no se transcribe en los sistemas de transcripción/traslación *in vitro*.

16. Solución reactivo que contiene:

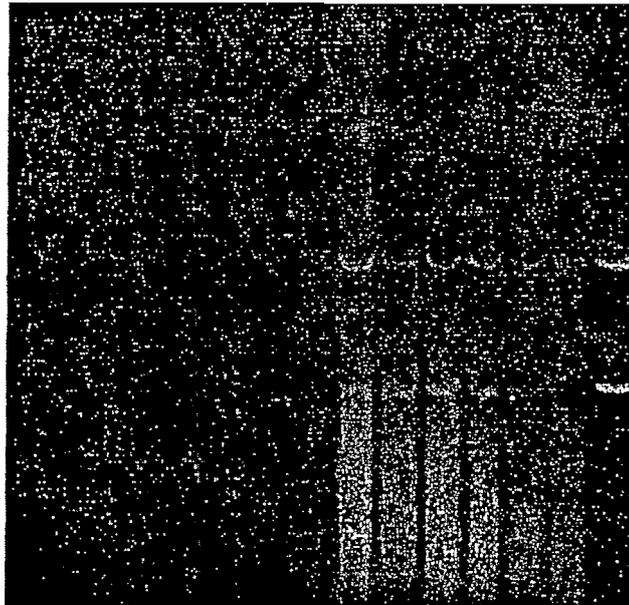
- un lisado que contiene ribosomas preparado a partir de células procarióticas o eucarióticas mediante un método para la producción de lisados para la traducción *in vitro*;
- uno o más de los 20 L-aminoácidos que se encuentran en la naturaleza;
- uno o más ARNts de los que se encuentran en la naturaleza o sintéticos;
- uno o más de los nucleótidos que se encuentran en la naturaleza, los cuales pueden estar sin fosforilar o estar presentes como monofosfatos, difosfatos o trifosfatos, y
- ADN lineal el cual no se transcribe en los sistemas de transcripción/traslación *in vitro*.

Figura 1

Plásmido es-
cindido sin
adición de ADN

Plásmido escindido
con adición de ADN

M 0 2 5 30 60 120 0 2 5 30 60 120



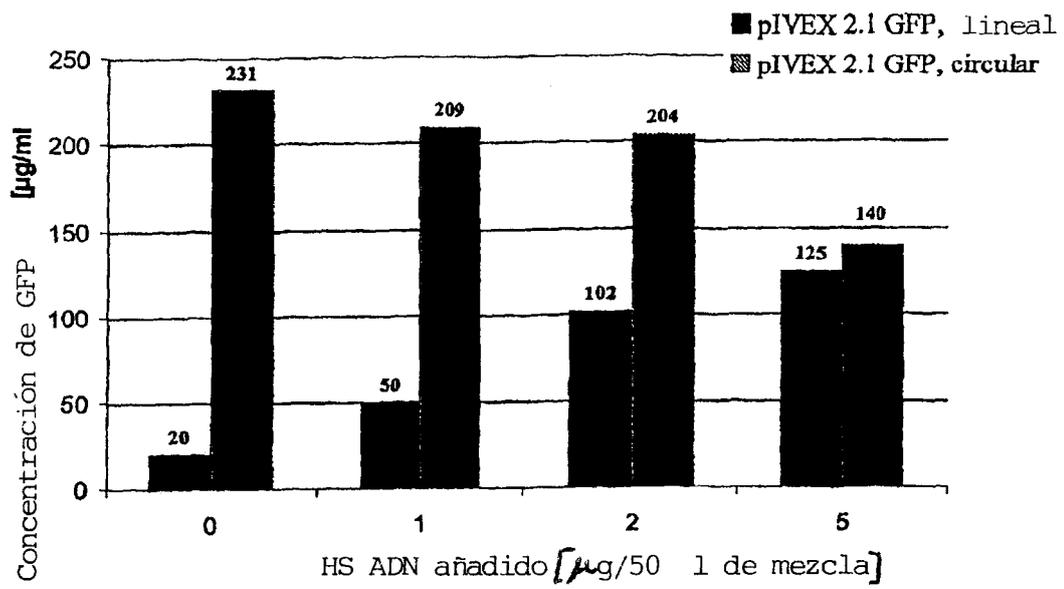


Figura 2

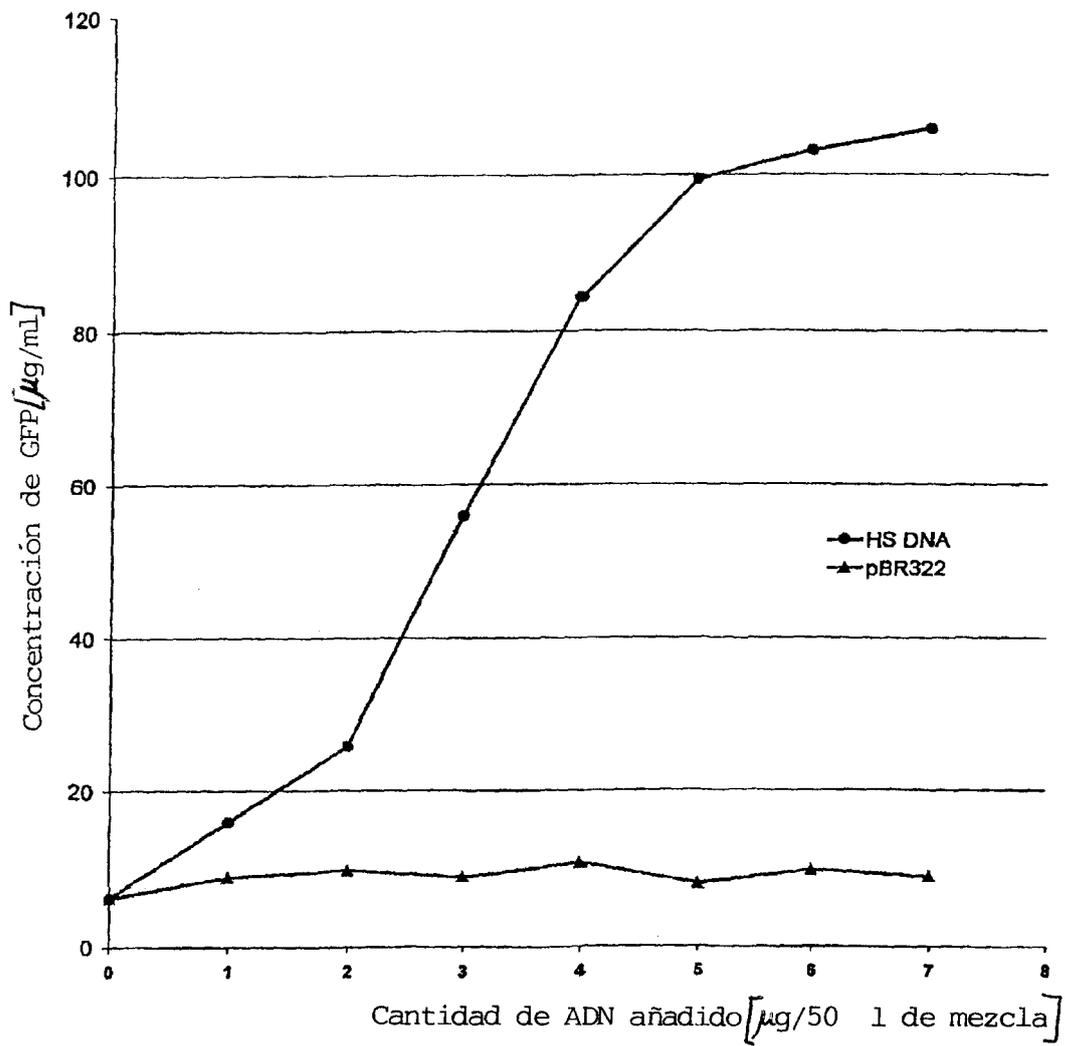


Figura 3

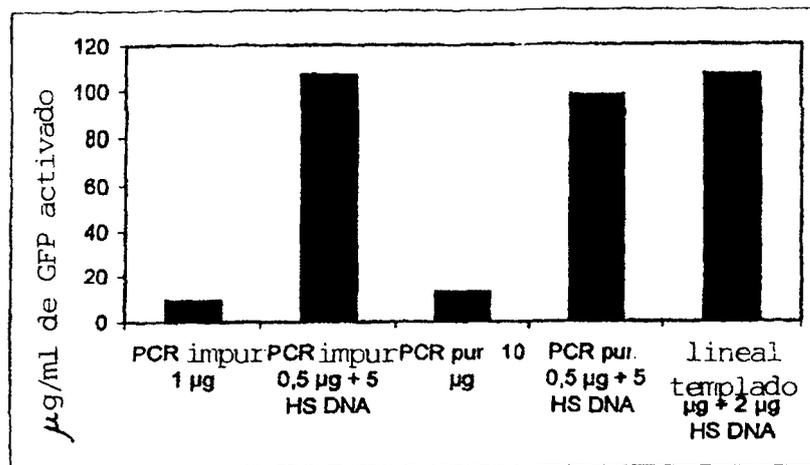


Figura 4