

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 314**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2006 E 06805529 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1951870**

54 Título: **Constructos de ADN para la inhibición específica de la expresión génica mediante interferencia de ARN**

30 Prioridad:

25.11.2005 EP 05025727

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

30.08.2013

73 Titular/es:

**MOLOGEN AG (100.0%)
FABECKSTRASSE 30
14195 BERLIN, DE**

72 Inventor/es:

**SCHROFF, MATTHIAS y
OSWLAD, DETLEF**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 421 314 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

Constructos de ADN para la inhibición específica de la expresión génica mediante interferencia de ARN

La invención se refiere a procedimientos para la preparación de vectores que son adecuados para inhibir tras su transfección en células eucariotas de manera selectiva la formación de una o varias proteínas mediante interferencia de ARN así como a vectores de este tipo.

Una posibilidad recientemente probada de la inhibición de la expresión génica se basa en la generación de moléculas de ARN bicatenarias. Con este ARN bicatenario (ARNbc) pueden desactivarse de manera selectiva genes individuales de manera altamente eficaz y más rápidamente que con cualquier otro procedimiento, sin alterar la formación de proteínas de genes adyacentes. El principio subyacente se designa como interferencia de ARN, de manera abreviada iARN. La secuencia de ARNbc que causa este fenómeno como ARNip (*small interference RNA*, ARN de interferencia pequeño).

El ARNip no impide la lectura del gen, sino que conecta un mecanismo propio de la célula que impide los ARNm leídos por el gen y así la formación de correspondientes proteínas (*post-transcriptional gene silencing*, silenciamiento génico postranscripcional).

Esta degradación de ARNm selectiva se activa mediante moléculas cortas de ARNip con 19-23 bases de ARN de longitud, que son homólogas al ARNm diana, cuya conversión en una proteína debe impedirse. Las moléculas de ARNip se acoplan con endorribonucleasas especiales para dar un complejo de ARN-proteína propio de la célula con la denominación "RISC" (*RNA induced silencing complexes*, complejos de silenciamiento inducidos por ARN). En la construcción de estos complejos se disocian las dos cadenas de ARN una de otra, de manera que se producen los denominados RISC activados que contienen respectivamente una cadena sencilla de la molécula de ARNip. Los RISC activados que contienen la cadena antisentido, que es complementaria al ARNm diana, se unen a éste y la endorribonucleasa del complejo ARN-proteína se ocupa ahora de la degradación de ARNm específica de secuencia.

El ARNip puede generarse en la célula de manera experimental o puede introducirse mediante infiltración desde fuera. Por un lado se logra esto a través de moléculas de ARNip preparadas sintéticamente que pueden administrarse tanto *in-vitro* como *in-vivo*.

Este procedimiento tiene sin embargo límites técnicos. Además de la inestabilidad general del ARNip sintético en el medio como también en la célula, es posible la inhibición por medio de ARNip sintético en principio sólo de manera temporal y muchas células (por ejemplo células neuronales) solo pueden transfectarse de manera muy ineficaz. Los estudios que se basan en la transfección de ARNip sintético están limitados, por tanto, por regla general tanto temporalmente a 1 - 5 días como específicamente al tipo de célula. Además son desventajosos los altos costes de producción y la larga duración de producción.

El documento WO 2004/044135 da a conocer compuestos oligoméricos para la modulación de la expresión génica por medio de interferencia de ARN. A este respecto, los compuestos oligoméricos comprenden dos oligómeros que hibridan entre sí al menos parcialmente y de los cuales uno puede hibridar a su vez con ácidos nucleicos diana para suprimir la expresión génica. Al menos uno de los oligómeros tiene una estructura secundaria no lineal o es parte de una disposición oligomérica múltiple.

Sin embargo, ARNip puede generarse también mediante vectores en la célula. A este respecto se trata de vectores virales o a base de plásmido que conducen solamente en la célula mediante expresión a la formación de las secuencias de ARNip. Las ventajas en comparación con la transfección con ARNip sintético se encuentran en la transcripción más estable y eventualmente más regulada de la correspondiente secuencia de ARNip.

Sin embargo, los vectores a base de plásmido muestran además de una baja eficacia de transfección igualmente un procedimiento de producción costoso. Así es necesario seleccionar clones estables. En este procedimiento con frecuencia de larga duración, que puede durar semanas e incluso también meses, se llega con frecuencia a la aparición de numerosas dificultades potenciales que son inherentes de experimentos de clonación. Para la comprobación del producto son necesarias secuenciaciones que igualmente son laboriosas y caras.

Además, los vectores a base de plásmido contienen genes resistentes a antibióticos que son necesarios para su selección. Por este motivo no son adecuados vectores de este tipo para su uso en organismos vivos. La posible recombinación con bacterias que se producen de manera ubicua en el organismo, encierra el riesgo de una aparición creciente de bacterias resistentes a antibióticos. La extensión de resistencias a antibióticos es un problema grave y no asumible.

Dado que los vectores virales pueden realizar la transfección de manera eficaz y selectiva, éstos ofrecen una ventaja en comparación con moléculas de ARNip sintéticas como también vectores a base de plásmido.

Para la aplicación terapéutica pueden usarse vectores virales de este tipo, aunque con reservas. También en este caso la recombinación de secuencias virales con virus que se producen en la naturaleza representa un riesgo de seguridad inherente, dado que puede temerse la generación de nuevos virus híbridos patógenos. Además, su

preparación es también costosa y cara.

Dado que ya únicamente la inhibición de la expresión de sólo un producto génico usando sistemas de expresión está unida con una multiplicidad de complicaciones, se entiende casi por sí mismo que la desactivación simultánea de la expresión de varios productos génicos en una célula o un tejido ha de obtenerse claramente de manera más compleja y por consiguiente más difícil.

La baja probabilidad de que una célula se transfecte únicamente por solo un constructo representa uno de los problemas principales en la inhibición múltiple de la expresión génica mediante interferencia de ARN, para el caso del uso de varios constructos independientes. Esta baja probabilidad se potencia negativamente con el número de constructos usados. Con frecuencia, sin embargo, es necesaria para determinados planteamientos terapéuticos genéticos una inhibición controlada, simultánea de la expresión génica.

Existe una multiplicidad de procedimientos que permiten la cotranscripción de varios ARN en una célula. El procedimiento más sencillo es la cotransfección de dos constructos de expresión independientes (a continuación también: vectores). Otro procedimiento consiste en la transfección con un vector que porta dos casetes de expresión independientes. Los constructos de este tipo pueden usarse también para la generación de ARNip.

Sin embargo, en las dos posibilidades existe el riesgo de que los transcritos se diferencien significativamente con respecto a su número, procesamiento, tiempo de vida medio y efectividad traduccional y por consiguiente en la cantidad de la proteína expresada, de modo que su uso esté caracterizado por la inefectividad y la mala reproducibilidad. Por tanto, el uso de sistemas de expresión de este tipo conduciría también a una transcripción de distinta intensidad de ARNip, de manera que por último se obtendría una inhibición desigual de los respectivos genes.

La construcción de ARN di y policistrónicos mediante el uso de elementos IRES (*Internal Ribosome Entry Site*, sitio interno de entrada en el ribosoma) representa otra posibilidad para la coexpresión de varios genes. Estos permiten la iniciación de la traducción mediante ribosomas independientemente de la estructura de caperuza de ARNm mediante elementos de secuencia. Por primera vez se descubrieron elementos IRES en el ARNm del picornavirus (Pelletier y Sonenberg, 1988, Nature 334: 320-325, Jang *et al.*, 1988, Journal Virology 62: 2636-2643).

Para la construcción de vectores bicistrónicos se usan lo más frecuentemente los elementos IRES del poliovirus y del VEMC (virus de la encefalomiocarditis) (Dirks *et al.*, 1993, Gene 128: 247-249). De manera desventajosa varía su efectividad mucho dependiendo de la línea celular usada (Borman *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25:925-932).

La mayoría de los casetes de expresión bicistrónicos disponibles están constituidos por un marcador que puede seleccionarse o un gen indicador, que están dispuestos en el lado 3' del elemento IRES y un MCS (*Multiple Cloning Site*, sitio de clonación múltiple) para la inserción del gen deseado (Dirks *et al.*, 1993, Gene 128: 247-249). Igualmente se conocen sistemas de expresión tri y policistrónicos usando elementos IRES (Zitvogel *et al.*, 1994, Hum Gene Ther 5: 1493-1506, Fussenegger *et al.*, 1998a, Nature Biotechnol. 16: 468-472, Mielke *et al.*, 2000, Gene 254. 1-8).

Para la aplicación terapéutica pueden usarse elementos IRES virales, pero sólo con reservas. La recombinación de secuencias virales con virus que se producen en la naturaleza representa también en este caso un riesgo de seguridad inherente, dado que hay que temer la generación de nuevos virus híbridos patógenos.

Los vectores multicistrónicos pueden construirse también mediante el enlace de unidades de transcripción sin elementos IRES. Por un lado pueden clonarse los genes deseados a través de distintos MCS en un vector de plásmido, y por otro lado pueden enlazarse casetes de expresión aislados de plásmidos mediante adaptadores de ADN para dar vectores multicistrónicos lineales (Tsang *et al.*, 1997, Bio Techniques 22: 68).

Sin embargo, ciertos estudios de las velocidades de expresión de genes lineales enlazados en cis mostraron una fuerte influencia negativa sobre la transcripción de casetes de expresión dispuestos de esta manera (Esperet *et al.*, 2000, J Biol Chem 275:25831-25839).

Los vectores de plásmido para la expresión de múltiples genes se diferencian de los vectores de plásmido habituales por el número de unidades de transcripción clonadas. A este respecto pueden usarse promotores o secuencias de poli(A) de igual o distinto origen para las unidades de transcripción.

La desventaja que resulta del uso de distintos promotores consiste en que los promotores se diferencian en su intensidad y así pueden variar las velocidades de expresión de los genes individuales, mientras que el uso de promotores iguales puede conducir a la formación de estructuras secundarias del ADN que pueden tener como consecuencia una pérdida de función de los promotores.

Es común a todos los vectores mencionados para la expresión génica múltiple que o bien se basan en plásmidos o en vectores virales. Además de todas las insuficiencias descritas de los vectores actuales que codifican múltiples veces, éstos presentan adicionalmente los inconvenientes de este tipo de vectores. Se conocen suficientemente los inconvenientes de vectores virales, a los que pertenecen la inestabilidad de la cepa de vacuna atenuada, y las

insuficiencias de vectores de ADN de plásmido, tales como la extensión de genes resistentes a antibióticos que acompaña a su uso (descrito detalladamente en el documento EP 0 941 318 B1).

5 El documento US 2004/0053876 da a conocer estructuras de ARNip en forma de horquilla así como ADN que codifica para estructuras de ARNip en forma de horquilla para la supresión de la expresión génica así como su preparación. Es también posible que más de un ARNip en forma de horquilla esté presente en un constructo de ARN. Como constructos de ADN se mencionan plásmidos y vectores virales. Por tanto presentan las desventajas conocidas de estos constructos de ADN (véase anteriormente).

10 El documento EP 0 941 318 B1 (por el documento WO 98/21322) se refiere a un constructo de ácido nucleico que puede realizar la expresión, que contiene sólo la información de secuencia necesaria para la expresión de un gen para la síntesis de ARN o proteínas. Tales constructos de expresión pueden usarse en la terapia génica y vacunación genética y evitan muchos riesgos asociados con los constructos actuales. Sin embargo estos constructos codifican respectivamente sólo para un gen o un ARN.

15 Por tanto serían deseables sistemas de expresión para ARNip que también pudieran inhibir simultáneamente la expresión génica de varios genes. Una unión (adaptador) de las secuencias para la generación de los ARNip que garantiza una transcripción respectivamente suficiente para la inhibición de la expresión génica de estas secuencias representa el problema probablemente mayor en la solución de este planteamiento,. Un procedimiento para el enlace de fragmentos de ADN mediante elementos de unión de ADN se conoce por la bibliografía. Seeman describe secuencias de ADN para el estudio de ramificaciones que se producen en la naturaleza, las denominadas uniones Holliday, que se postulan como formas especiales topológicas de ADN-B bajo estrés torsional (Seeman: 1982, J Theor Biol 99: 237-247; Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1998. 27:225-248). El uso de estas estructuras sigue estando limitado hasta el momento a trozos cortos de oligonucleótidos para el estudio de formas estructurales de ADN.

25 El documento WO 2004/016786 se refiere a un constructo de expresión de ADN para la expresión génica múltiple, además a un procedimiento para su preparación y a una molécula de unión (adaptador) para el enlace de casetes de expresión de ADN para la preparación de un constructo de expresión de ADN para la expresión génica múltiple, así como por último a posibilidades de uso en la vacunación genética. Sin embargo en este caso se enlazan distintos casetes de expresión pero completos, es decir cada casete de expresión tiene su propio promotor y su propia secuencia codificante. Estos se enlazan entre sí a través de estructuras Holliday.

30 Por el documento DE 100 48 417 A1 se conoce una unión polifuncional que describe la conjugación de dos grupos funcionales reactivos por medio de un adaptador. Como sustancias biológicas que pueden acoplarse de esta manera se mencionan también ácidos nucleicos, sin embargo los ejemplos muestran sólo las aplicaciones de la invención para la conjugación de péptidos. El documento WO 01/87348 A2 describe otro planteamiento para infiltrar varios genes para la expresión eficaz en células. Los ácidos nucleicos deben enlazarse mediante uniones covalentes para dar estructuras supramoleculares, los denominados dendrímeros.

35 <http://www.ambion.com> muestra otra posibilidad de preparar vectores para ARNip. Este procedimiento evita las desventajas mencionadas anteriormente. Sin embargo este procedimiento de producción requiere mucho tiempo y está muy sujeto a fallos mediante una serie de etapas necesarias de multiplicación de las respectivas secuencias por medio de PCR (*polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa). La posibilidad de generación de mutaciones tanto indeseadas como inadvertidas que se potencian aún mediante el procedimiento de PCR es muy grande. Así son necesarias también en este caso secuenciaciones control que prolongan el procedimiento de preparación y contribuyen a costes elevados.

40 Partiendo de este estado de la técnica es objetivo de la invención facilitar un procedimiento adecuado para la síntesis *in-vitro* o *in-vivo* de una o varias secuencias de ARNip definidas, los constructos de expresión preparados mediante esto así como un kit para la realización de la síntesis.

45 Este objetivo se consigue mediante las características de las reivindicaciones independientes.

50 De acuerdo con la invención está previsto según esto un constructo de expresión que está constituido por una primera estructura de horquilla de terminación de ADN, en la que una cadena sencilla de desoxirribonucleótidos está replegada para dar una región bicatenaria de manera que ésta presenta un extremo con proyección cohesiva y en el extremo opuesto están unidas entre sí las cadenas sencillas que forman la cadena doble mediante un bucle monocatenario, una segunda estructura de horquilla de terminación, que está estructurada de manera análoga a la primera estructura de horquilla de terminación y una estructura de ADN en forma de T con tres brazos de ADN bicatenario que están unidos a través de uniones Holliday, conteniendo al menos un brazo las secuencias que van a transcribirse y estando unidas entre sí las cadenas sencillas de este brazo de cadena doble de ADN en el extremo que está opuesto a la unión con los otros brazos mediante un bucle de ADN monocatenario, y los otros dos brazos presentan extremos cohesivos, presentando un brazo una secuencia de terminación adecuada y el otro brazo una secuencia de promotor adecuada.

55 Los componentes mencionados representan los componentes esenciales de un constructo de acuerdo con la invención. Por la invención están comprendidos también constructos de expresión que presentan estos

componentes, derivándose éstos sin embargo de otras combinaciones de estructuras de ADN.

De acuerdo con la invención está previsto además un constructo de expresión para la inhibición selectiva de la expresión génica por medio de interferencia de ARN que presenta una primera estructura de horquilla de terminación de ADN, en la que una cadena sencilla de desoxirribonucleótidos está replegada para dar una región bicatenaria de manera que ésta presenta un extremo con proyección cohesiva y en el extremo opuesto están unidas entre sí las cadenas sencillas que forman la cadena doble mediante un bucle monocatenario, además una segunda estructura de horquilla de terminación que está estructurada de manera análoga a la primera estructura de horquilla de terminación, y cuya región bicatenaria y monocatenaria está constituida por la secuencia que va a transcribirse así como una secuencia de promotor adecuada y una secuencia de terminación complementaria inversa adecuada, que se encuentran entre las dos estructuras de horquilla de terminación descritas anteriormente en una cadena doble de ADN.

Un constructo de expresión de este tipo presenta sólo una copia bicatenaria del ARNip que va a generarse. La generación de un ARNip en caso de existir sólo una copia es posible con este constructo, dado que se leen y se transcriben las secuencias que van a transcribirse por la ARN-polimerasa por encima del bucle monocatenario. Esto no sería posible con un plásmido bicatenario.

Para los dos constructos de expresión de acuerdo con la invención está previsto que varias estructuras de ADN lineales o en forma de T estén unidas respectivamente en un extremo mediante un adaptador por medio de uniones Holliday. En este caso está previsto que las secuencias que van a transcribirse codifiquen para genes idénticos o distintos.

Por adaptador debe entenderse oligonucleótidos para la unión de casetes de expresión de ADN. Un adaptador de acuerdo con la invención está constituido por dos o más cadenas, tal como se ilustrará en el siguiente ejemplo de un adaptador, formado por tres oligonucleótidos que están unidos con tres casetes de expresión en cadenas unidas entre sí A, B y C: el extremo 5' de A tiene con respecto al extremo 3' de B una secuencia complementaria y forma una cadena doble, mientras que el extremo 3' de A se aparea con el extremo 5' de C y finalmente el extremo 5' de B se aparea con el extremo 3' de C. Este tipo de unión de cadenas dobles de ADN se denomina también unión Holliday (F.W. Stahl: Genetics. 1994 Oct;138(2):241-6) que ofrece la ventaja de que se usan exclusivamente elementos que se producen en la naturaleza para la unión de los casetes de expresión, lo que puede resultar especialmente ventajoso con un uso de la invención para fines médicos por motivos toxicológicos.

Las secuencias de oligodesoxinucleótidos usadas para las ramificaciones de ADN se seleccionan de modo que en la hibridación en los extremos 5' de los oligonucleótidos (por ejemplo) se genera en cada caso un extremo cohesivo que sobresale de cuatro bases de longitud. Las secuencias de los extremos cohesivos pueden diferenciarse para cada brazo de una ramificación, pero no necesariamente. Las estructuras de ADN lineales o en forma de T presentan una proyección complementaria al extremo cohesivo. Mediante esto se posibilita la ligación selectiva de los casetes de expresión en los "brazos" individuales de las ramificaciones.

Los constructos de expresión de acuerdo con la invención configurados de esta manera son adecuados para la inhibición selectiva múltiple de la expresión génica de diversos genes. Debido a la construcción idéntica de las estructuras en forma de T que contienen respectivamente las secuencias necesarias para la generación de los ARNip, los diversos ARNip se generan con igual intensidad. El número de genes cuya expresión de proteínas se inhibe depende del número de las estructuras en forma de T unidas entre sí a través del adaptador.

Ventajosamente, en una forma de realización alternativa del constructo de expresión de acuerdo con la invención se seleccionan de manera específica y distinta los extremos cohesivos de componentes individuales para la unión selectiva con otros componentes. Debido a ello se posibilita la construcción selectiva del constructo de expresión deseado.

Un constructo de expresión de ADN que contiene las secuencias para la generación de uno o varios ARNip puede transfectar células de manera selectiva.

Por transfección debe entenderse la introducción de secuencias de ácido nucleico por medio de procedimientos biológicos, químicos o físicos en la célula, en consecuencia de lo cual se llega a expresión continua o temporal de transcritos de ARN catalíticamente eficaces codificados por estas secuencias en la célula transfectada.

Los constructos de expresión de acuerdo con la invención presentan en un perfeccionamiento unidos covalentemente uno o varios péptidos, proteínas, hidratos de carbono, anticuerpos o esteroides.

Otro objetivo de la presente invención son procedimientos de preparación para constructos de expresión que tras su transfección en células eucariotas inhiben la formación de proteínas definidas de manera selectiva mediante interferencia de ARN.

Para constructos de expresión lineales está previsto un procedimiento que comienza en la etapa de procedimiento a) con el mezclado de una cadena doble de ADN que contiene una copia singular de 19 - 23 bases de longitud de una secuencia génica o su secuencia complementaria inversa así como una señal de terminación para ARN-polimerasas

y está terminada mediante un bucle de secuencia de 8 - 12 bases de longitud en un extremo, que se selecciona de modo que bases opuestas no sean en ningún caso complementarias una con respecto a otra y las cadenas sencillas de ADN flanqueantes estén unidas entre sí para dar una cadena doble de ADN que en el otro extremo presenta una cadena sencilla de ADN corta que sobresale, con un oligodesoxinucleótido en forma de horquilla que en el extremo presenta extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen en la etapa de procedimiento b) y en la etapa de procedimiento c) un promotor con extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen, pudiéndose aparear el extremo 5' monocatenario del promotor con el oligodesoxinucleótido en forma de horquilla o la doble cadena de 10 a 1000 bases de longitud y siendo el extremo 3' monocatenario del promotor complementario al extremo 5' monocatenario de la cadena doble de ADN descrita en a) y ligación posterior de los fragmentos de ADN en la etapa de procedimiento d) así como purificación final de los vectores preparados en la última etapa de procedimiento e).

Opcionalmente, el procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de constructos de expresión lineales está configurado de manera que antes de la adición del oligodesoxinucleótido en forma de horquilla en la etapa de procedimiento c) se añade una cadena doble de ADN de 10 a 1000 bases (= n) de longitud de una secuencia no codificante con extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen, pudiéndose aparear el extremo 3' monocatenario con el extremo 5' monocatenario del promotor y siendo el extremo 5' monocatenario complementario al extremo 3' monocatenario del oligodesoxinucleótido en forma de horquilla.

Para la preparación de constructos de expresión en forma de T que tras su transfección en células eucariotas inhiben la formación de proteínas definidas de manera selectiva mediante interferencia de ARN, está previsto un procedimiento que comienza en la etapa de procedimiento a) con el mezclado de una cadena doble de ADN en forma de T que contiene una copia singular de 19 - 23 bases de longitud de una secuencia génica en dirección 5' - 3' así como una señal de terminación para ARN-polimerasas y está terminada mediante un bucle de secuencia de 8 - 12 bases de longitud en un extremo, que se selecciona de modo que bases opuestas no sean en ningún caso complementarias una con respecto a otra y las regiones de cadena doble flanqueantes estén unidas entre sí así mediante dos cadenas sencillas de ADN y en el otro extremo presenta dos cadenas sencillas de ADN cortas que sobresalen, y un oligodesoxinucleótido cuya secuencia es complementaria a las dos cadenas sencillas de ADN cortas que sobresalen y forma dos extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen, en la etapa de procedimiento b) con un oligodesoxinucleótido en forma de horquilla que en el extremo presenta extremos cortos que sobresale de ADN monocatenario y en la etapa de procedimiento c) otro oligodesoxinucleótido en forma de horquilla que en el extremo presenta extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen, de manera complementaria a la cadena doble de ADN en forma de T de a) y en la etapa de procedimiento d) un promotor con extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen, pudiéndose aparear el extremo 5' monocatenario del promotor con el oligodesoxinucleótido en forma de horquilla de b) y siendo el extremo 3' monocatenario del promotor complementario al extremo 5' monocatenario de la cadena doble de ADN en forma de T, seguido de ligación posterior de los fragmentos de ADN en la etapa de procedimiento e), pudiéndose preparar el constructo también sin la cadena doble de ADN de 10 a 1000 bases de longitud así como purificación final de los vectores preparados en la etapa de procedimiento final f).

Este procedimiento de preparación presenta de acuerdo con la invención tras la etapa de procedimiento c) la adición de una cadena doble de ADN de 10 a 1000 bases (= n) de longitud de una secuencia no codificante con extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen, pudiéndose aparear el extremo 3' monocatenario con el extremo 5' monocatenario del promotor y siendo el extremo 5' monocatenario complementario al extremo 3' monocatenario de oligodesoxinucleótido en forma de horquilla de la etapa de procedimiento b) y/o la adición de una cadena doble de ADN de 10 a 1000 bases (= n) de longitud de una secuencia no codificante con extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen, pudiéndose aparear el extremo 5' monocatenario con el extremo 3' monocatenario de la cadena doble de ADN en forma de T y siendo el extremo 3' monocatenario complementario al extremo 5' monocatenario del oligodesoxinucleótido en forma de horquilla de la etapa de procedimiento c).

En una forma de realización preferente está previsto un procedimiento, en el que el promotor es parte de un plásmido que puede amplificarse de manera bacteriana que se corta antes del mezclado de los componentes con una endonucleasa de restricción que reconoce un sitio de corte que flanquea al promotor en el plásmido y que no está presente en la molécula que va a prepararse.

Básicamente están previstos como promotores aquellos promotores que en las células diana, o sea las células en las que debe impedirse la expresión génica, pueden operarse. Preferentemente estos promotores son de origen humano siempre que se transfecten células o tejidos humanos con los constructos de expresión de acuerdo con la invención. Sin embargo pueden ser igualmente de origen viral, bacteriano o parásito o pueden proceder de especies distintas a la de la especie diana. A este respecto están previstos como promotor en particular, pero no exclusivamente, el promotor U6 humano, el promotor H1 humano, el promotor U6 murino, el promotor CMV y el promotor 7SK.

Además está previsto de acuerdo con la invención que en el caso del uso de un promotor como parte de un plásmido que puede amplificarse por vía bacteriana se realice la etapa de ligación en presencia de la endonucleasa de restricción con la que se cortó el promotor del plásmido.

En una forma de realización se realiza antes de la etapa de purificación final una digestión de la mezcla de reacción por medio de una exonucleasa específica exclusivamente para extremos de ADN 3' o 5'.

5 En el procedimiento de acuerdo con la invención, la cadena doble de ADN, que se añade al inicio del mezclado, puede resultar del apareamiento de un oligodesoxinucleótido parcialmente autocomplementario o de dos oligodesoxinucleótidos complementarios. El apareamiento puede realizarse también en primer lugar en la mezcla de reacción, de modo que al inicio del procedimiento de acuerdo con la invención se añadan únicamente oligodesoxinucleótidos monocatenarios complementarios.

10 La secuencia de los oligodesoxinucleótidos se selecciona en una forma de realización preferente de modo que las horquillas resultantes de esto presentan en su región bicatenaria la secuencia de reconocimiento para una endonucleasa de restricción.

La purificación final de los vectores preparados por medio del procedimiento de acuerdo con la invención se realiza preferentemente o bien mediante cromatografía o electroforesis en gel.

15 Si el promotor se usa como parte de un plásmido que puede amplificarse de manera bacteriana en el procedimiento de preparación de acuerdo con la invención, entonces en caso de la endonucleasa de restricción con la que puede cortarse el promotor del plásmido se trata de una enzima del grupo de las endonucleasas de restricción de clase II, preferentemente del grupo BbsI, BbvI, BbvII, BpI; BpII, BsaI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BspMI, Eam1104I, EarI, Eco31I, Esp3I, FokI, HgaI, SfaNI o sus isoesquizómeros.

20 Otro objeto de la presente invención es un kit para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención que contiene al menos un promotor, oligodesoxinucleótidos en forma de horquilla y enzimas. En caso de las enzimas se trata de ligasas, endonucleasas de restricción, exonucleasas de restricción, cinasas y polimerasas o combinaciones seleccionadas de las mismas, en forma de una mezcla de enzimas. Adicionalmente, el kit dependiendo de la forma de realización puede contener aún medios para la realización de las reacciones enzimáticas así como medios para la purificación de los vectores de preparación. El promotor puede estar contenido en el kit como parte de un plásmido, del cual puede cortarse éste usando una endonucleasa de restricción adecuada.

25 Además está previsto un kit que posibilite la síntesis de los constructos de expresión de iARN múltiples que contienen la estructura en forma de T descrita. A este respecto está contenido con respecto a los componentes mencionados ya en el kit también aún una estructura en forma de T, en la que puede insertarse la secuencia deseada en el brazo bicatenario con la secuencia que va a transcribirse.

30 Los constructos de expresión de acuerdo con la invención para la inhibición selectiva de la expresión génica por medio de interferencia de ARN son adecuados, siempre que se use un adaptador con uniones Holliday, para la inhibición de la expresión génica de varios genes. Debido a la estructura especial de los constructos de acuerdo con la invención se leen las secuencias que van a transcribirse para la formación del ARNip en igual medida mediante la ARN-polimerasa.

35 El número de genes que se inhiben tras la transfección de un constructo de inhibición múltiple de acuerdo con la invención depende del número de brazos bicatenarios que presenta el adaptador.

40 Con respecto a la presente invención ni la cotransfección de dos vectores separados ni el procedimiento descrito en el documento DE 100 48 417 A1 de unir las secuencias génicas codificantes junto con los elementos de control necesarios (promotor, señal polo(A)) químicamente entre sí es un estado de la técnica evidente. Si bien en la cotransfección se llevan por medio de lipofección igualmente vectores distintos a proximidad espacial uno con respecto a otro y se infiltran en la célula, sin embargo el principio subyacente de este procedimiento es otro. Además se producen desventajosamente mediante la conjugación química descrita de constructos de expresión estructuras con un peso molecular claramente superior, que pueden infiltrarse de manera conocida más difícilmente en células. Lo mismo se aplica también al procedimiento descrito en el documento WO 01/87348 A2 para la construcción de un dendrímero que contiene ácidos nucleicos. Adicionalmente, el procedimiento descrito para la construcción de dendrímeros es un procedimiento de preparación de múltiples etapas y costoso.

45 Otro objeto de la presente invención es un fármaco, preferentemente una vacuna que contiene uno de los constructos de expresión de acuerdo con la invención. Los fármacos de este tipo pueden administrarse en seres humanos y animales local y sistémicamente y son adecuados para el tratamiento de infecciones, por ejemplo infecciones por virus herpes, virus de papiloma o lentivirus, para el tratamiento de trastornos metabólicos, tales como por ejemplo la enfermedad de Parkinson o de la fibrosis quística, para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, para el tratamiento de enfermedades cancerígenas, tales como por ejemplo carcinomas, melanomas o sarcomas, para el tratamiento de otras enfermedades, tales como por ejemplo de la degeneración macular asociada a la edad, y para el tratamiento tras inflamaciones, lesiones o intervenciones quirúrgicas que pueden afectar por ejemplo a la médula espinal, el cerebro u otros órganos.

55 Otras medidas ventajosas se describen en las demás reivindicaciones dependientes; la invención se describe en más detalle por medio de ejemplos de realización y de las siguientes figuras; se muestra:

- la figura 1 componentes de los vectores de ARNip lineales
- la figura 2 componentes de los vectores de ARNip en forma de T
- la figura 3 componentes de los vectores de di-ARNip en forma de T
- la figura 4 componentes de los vectores de triple-ARNip en forma de T
- 5 la figura 5 representación detallada del bucle de secuencia diana de los constructos en forma de T
- la figura 6/7 resultados experimentales de la comparación del vector de expresión de ARNip en forma de T de acuerdo con la invención (TSiRNA-CDC2) con ARN sintético (CDC2-RNA) que contienen las secuencias diana idénticas.

La figura 1: muestra los componentes de los vectores de ARNip lineales

10 **A:** secuencia de ARNip que va a usarse en el procedimiento, que es homóloga al ARNm diana. La secuencia está constituida por una región sentido o antisentido (diana), un bucle de secuencia de 8 - 12 bases de longitud y una secuencia de terminación complementaria inversa. La secuencia de ARNip puede estar constituida por fragmentos de ODN individuales que con ayuda de la mezcla de enzimas deben aparearse, ligarse y eventualmente fosforilarse, ésta puede encontrarse también ya como fragmento de ODN completo. Además los

15 componentes que se ligan mediante la enzima ligasa en el fragmento de ODN. A este respecto se trata de la secuencia de promotor con correspondientes proyecciones complementarias y de un oligodinucleótido en forma de horquilla cuyas proyecciones complementarias y únicas a su vez de respectivamente 4 bases conduce a que se produzca un vector lineal cerrado covalentemente que está constituido por el promotor, la secuencia diana y la secuencia de terminación y en los extremos está cerrado en forma de horquilla. Entre el promotor y el oligonucleótido final puede colocarse una cadena doble de ADN de 10 a 1000 bases (= n) de longitud de una

20 secuencia no codificante con extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen.

B: para la transfección de producto final preparado

La figura 2: muestra los componentes de los vectores de ARNip en forma de T

25 **A:** secuencia de ARNip que va a usarse en el procedimiento que es homóloga al ARNm diana. La secuencia está constituida por la región sentido o antisentido (diana), un bucle de secuencia de 8 - 12 bases de longitud y una secuencia de terminación. La secuencia de ARNip puede estar constituida por fragmentos de ODN individuales que con ayuda de la mezcla de enzimas deben aparearse, ligarse y eventualmente fosforilarse, ésta puede encontrarse también ya como fragmento de ODN completo.

30 **B/C:** además los componentes que se ligan mediante la enzima ligasa en el fragmento de ODN. A este respecto se trata de la secuencia de promotor con correspondientes proyecciones complementarias y de oligodinucleótidos en forma de horquilla, cuyas proyecciones complementarias y únicas a su vez de respectivamente 4 bases conduce a que se produzca un vector cerrado covalentemente que está constituido por el promotor, el bucle sentido o bucle antisentido y secuencia de terminación y en los extremos está cerrado en forma de horquilla. Entre el promotor y el oligonucleótido final, así como entre la secuencia de terminación y el oligonucleótido final puede colocarse una cadena doble de ADN de 10 a 1000 bases (= n) de longitud de una

35 secuencia no codificante con extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen.

D: para la transfección de producto final preparado

La figura 3: muestra los componentes de los vectores de multi-ARNip en forma de T (di-constructo)

40 **A/B/C/D:** secuencias de ARNip que van a usarse en el procedimiento que son homólogas al ARNm diana. Las dos secuencias están constituidas por la región sentido o antisentido (diana A, diana B), un bucle de secuencia de 8 - 12 bases de longitud y una secuencia de terminación. Las secuencias de ARNip pueden estar constituidas por fragmentos de ODN individuales que con ayuda de la mezcla de enzimas deben aparearse, ligarse y eventualmente fosforilarse, éstas pueden encontrarse también ya como fragmento de ODN completo. Además los componentes que se ligan mediante la enzima ligasa en el fragmento de ODN. A este respecto se

45 trata de la secuencia de promotor con correspondientes proyecciones complementarias, de una cadena doble de ADN-adaptador y de oligodinucleótidos en forma de horquilla, cuyas proyecciones complementarias y únicas a su vez de respectivamente 4 bases conduce a que se produzca un vector cerrado covalentemente que está constituido por el promotor, el bucle sentido o bucle antisentido y la secuencia de terminación y en los extremos está cerrado en forma de horquilla. Entre el promotor y el oligonucleótido final, entre la secuencia de terminación y el oligonucleótido final así como respectivamente entre el adaptador y el promotor puede

50 colocarse una cadena doble de ADN de 10 a 1000 bases (= n) de longitud de una secuencia no codificante con extremos cortos que sobresale de ADN monocatenario.

E: para la transfección de producto final preparado

La figura 4: muestra los componentes de los vectores de multi-ARNip en forma de T (tri-constructo)

A/B/C/D/E: secuencias de ARNip que van a usarse en el procedimiento que son homólogas al ARNm diana. Las tres secuencias están constituidas por la región sentido o antisentido (diana A, diana B), un bucle de secuencia de 8 - 12 bases de longitud y una secuencia de terminación. Las secuencias de ARNip pueden estar constituidas por fragmentos de ODN individuales que con ayuda de la mezcla de enzimas deben aparearse, ligarse y eventualmente fosforilarse, éstas pueden encontrarse también ya como fragmento de ODN completo. Además los componentes, que se ligan mediante la enzima ligasa en el fragmento de ODN. A este respecto se trata de la secuencia de promotor con correspondientes proyecciones complementarias, de una cadena doble de ADN-adaptador y de oligodinucleótidos en forma de horquilla, cuyas proyecciones complementarias y únicas a su vez de respectivamente 4 bases conduce a que se produzca un vector cerrado covalentemente que está constituido por el promotor, el bucle sentido o bucle antisentido y la secuencia de terminación y en los extremos está cerrado en forma de horquilla. Entre el promotor y el oligonucleótido final, entre la secuencia de terminación y el oligonucleótido final así como respectivamente entre el adaptador y el promotor puede colocarse una cadena doble de ADN de 10 a 1000 bases (= n) de longitud de una secuencia no codificante con extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen.

F: para la transfección de producto final preparado

La figura 5 muestra una representación detallada del bucle de secuencia diana de los constructos en forma de T.

La figura 6: muestra los resultados de un experimento, en el que el vector de expresión de ARNip en forma de T de acuerdo con la invención (T-SiRNA-CDC2) se compara con ARN sintético (CDC2-RNA) que contienen las secuencias diana idénticas. El ARNm de CDC2 se determinó por medio de PCR en tiempo real cuantitativa tras la transfección de células HELA. Se usaron: vector de ARNip en forma de T preparado con el procedimiento de acuerdo con la invención, que contiene una secuencia diana de CDC2, ARN sintético de la misma secuencia diana de CDC2 y células no tratadas. Los valores representan valores promedio que se calcularon a partir de determinaciones múltiples. En las células no tratadas no se observó la supresión del ARNm de CDC2 tal como se esperaba. Por el contrario, las células tratadas con el vector de ARNip en forma de T así como el ARN sintético mostraron una cantidad de ARNm de CDC2 significativamente más baja. Ésta se ha reducido hasta el 96,7 % en comparación con el control positivo (células no tratadas).

La figura 7 muestra los resultados de un experimento, en el que el vector de expresión de ARNip en forma de T de acuerdo con la invención (T-SiRNA-CDC2) se compara con ARN sintético (CDC2-RNA), que contienen las secuencias diana idénticas. La proteína CDC2 se determinó por medio de inmunotransferencia tipo Western tras la transfección de células HELA. Se usaron: vector de ARNip en forma de T preparado con el procedimiento de acuerdo con la invención que contienen una secuencia diana de CDC2, ARN sintético de la misma secuencia diana de CDC2 y células no tratadas. Como patrón interno se usó β -tubulina. En las células no tratadas (banda 4) no se observó la supresión del ARNm de CDC2 tal como se esperaba. Por el contrario, las células tratadas con el constructor de ARNip en forma de T (banda 2) así como el ARN sintético (banda 3) mostraron una cantidad de proteína CDC2 significativamente más baja. La supresión de la expresión génica mediante los constructos de ARNip en forma de T, que se prepararon con un "kit de vector de expresión de ARNip" usando el procedimiento de acuerdo con la invención, puede compararse con los efectos de las transfecciones de ARN sintético. La supresión de la expresión génica se encuentra en las dos transfecciones en el intervalo entre el 94 - 96 %.

Ejemplo 1: preparación del vector de ARNip en forma de T para la supresión de la expresión de CDC2

El vector que codifica para el ARNip de CDC2 se obtuvo tal como sigue:

Los dos fragmentos de ODN para CDC2 se calentaron a 90 °C durante 3 min y se aparearon mediante enfriamiento lento. Debido a ello se obtuvo la siguiente secuencia que codifica para CDC2:

Sec. ID 1: TGGGGTCAGCTCGTTACTCTCTC

A este respecto, las 19 bases forman la cadena sentido, las siguientes 4 bases (subrayadas) el inicio de la secuencia de bucle.

La fosforilación mediante PNcinasa se realizó a continuación. Para la obtención de 10 microgramos de producto final se usaron 3,9 microgramos de CDC2. Tras la adición de 5,2 microgramos de promotor H1 (Sec. ID 2) así como de los oligodesoxinucleótidos en forma de horquilla fosforilado en 5' (Sec. ID 3 y 4):

Sec. ID 2: ATATTTGCAT GTCGCTATGT GTTCTGGGAA ATCACCATAA
 ACGTGAAATG TCTTTGGATT TGGGAATCTT ATAAGTTCTGT
 ATGAGAGCAC AGATAGGG

ES 2 421 314 T3

Sec. ID 3: 5'-PH-GGG AAA GCT TAG TTT TCT AAG CTT-3' (1,3 microgramo) y

Sec. ID 4: 5' PH-GTT GGA ATT CAG TTT TCT GAA TTC-3' (1,3 microgramo)

se ligaron con ayuda de la enzima T4-ADN ligasa los fragmentos individuales. La mezcla resultante en ácidos nucleicos se trató con la enzima T7-ADN-polimerasa. El producto final, el vector que expresa siRNALuc, se purificó mediante cromatografía en columna y estaba preparado para la transfección.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Mologen AG

10

<120> Constructos de ADN para la inhibición específica de la expresión génica mediante interferencia de ARN

<130> XI 1165-06

15

<150> EP 05025727.8

<151> 25-11-2005

<160> 4

20

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Oligodesoxinucleótido sintético

30

<220>

<221> misc_feature

<223> Las primeras 19 bases son CDC2 con sentido, las últimas 4 bases son el comienzo del bucle

<400> 1

tggggtcagc tcgttactct ctc

23

35

<210> 2

<211> 99

<212> ADN

<213> Homo sapiens

40

<220>

<221> misc_feature

<223> Promotor del Gen Humano para H1 RNA

45

<400> 2

atatttgcac gtcgctatgt gttctgggaa atcaccataa acgtgaaatg

tctttggatt 60

tggggaatcct ataagttctg tatgagagca cagataggg

99

50

<210> 3

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

55

<220>

<223> Oligodesoxinucleótido sintético

ES 2 421 314 T3

<220>
<221> misc_feature
<223> bucle 5-prima fosforilado-oligodesoxinucleótido

5 <400> 3

gggaaagctt agttttctaa gctt
24

<210> 4
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

10

<220>
<223> Oligodesoxinucleótido sintético

15

<220>
<221> misc_feature
<223> bucle 5-prima fosforilado-oligodesoxinucleótido

20 <400> 4

gttggaattc agttttctga attc
24

REIVINDICACIONES

1. Constructo de expresión de ADN para la inhibición selectiva de la expresión génica por medio de interferencia de ARN constituido por los siguientes componentes

- 5 a) una primera estructura de horquilla de terminación de ADN, en la que una cadena sencilla de desoxirribonucleótidos está replegada para dar una región bicatenaria de manera que ésta presenta en un extremo una proyección cohesiva y en el extremo opuesto un bucle monocatenario,
- b) una segunda estructura de horquilla de terminación, que está estructurada de manera análoga a la primera estructura de horquilla de terminación,
- 10 c) al menos una estructura de ADN en forma de T con tres brazos de ADN bicatenario que están unidos a través de uniones Holliday, en la que
 - i. un brazo contiene las secuencias que van a transcribirse y las cadenas sencillas de este brazo de cadena doble de ADN en el extremo que está opuesto a la unión con los otros brazos, están unidos entre sí mediante un bucle de ADN monocatenario, y
 - 15 ii. los otros dos brazos presentan extremos cohesivos, presentando un brazo una secuencia de terminación adecuada y el otro brazo una secuencia de promotor adecuada.

2. Constructo de expresión de ADN para la inhibición selectiva de la expresión génica por medio de interferencia de ARN constituido por los siguientes componentes

- 20 a) una primera estructura de horquilla de terminación de ADN, en la que una cadena sencilla de desoxirribonucleótidos está replegada para dar una región bicatenaria de manera que ésta presenta un extremo con proyección cohesiva y en el extremo opuesto las cadenas sencillas que forman la cadena doble están unidas entre sí mediante un bucle monocatenario,
- b) una segunda estructura de horquilla de terminación, que está estructurada de manera análoga a la primera estructura de horquilla de terminación y cuya región bicatenaria y monocatenaria está constituida por la secuencia que va a transcribirse
- 25 c) una secuencia de promotor adecuada y una secuencia de terminación complementaria inversa adecuada que se encuentran entre las dos estructuras de horquilla de terminación descritas en a) y b) en una cadena doble de ADN.

3. Constructo de expresión de ADN según la reivindicación 1, en el que varias estructuras de ADN en forma de T están unidas respectivamente en un extremo mediante un adaptador por medio de uniones Holliday.

30 4. Constructo de expresión de ADN según la reivindicación 2, en el que varias estructuras de ADN lineales están unidas respectivamente en un extremo mediante un adaptador por medio de uniones Holliday.

5. Constructo de expresión de ADN según al menos una de las reivindicaciones anteriores, en el que los extremos cohesivos de componentes individuales están seleccionados de manera específica y distinta para la unión selectiva con otros componentes.

35 6. Constructo de expresión de ADN para la inhibición selectiva de la expresión de uno o varios genes según al menos una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las secuencias que van a transcribirse codifican para genes idénticos o distintos.

40 7. Constructo de expresión de ADN para la inhibición selectiva de la expresión de uno o varios genes según al menos una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la protección frente a degradación por exonucleasas se consigue mediante una región de cadena sencilla corta de tres a ocho desoxinucleótidos, que enlaza covalentemente entre sí las dos cadenas de la cadena doble lineal.

8. Constructo de expresión de ADN para la inhibición selectiva de la expresión de uno o varios genes según al menos una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que éste está enlazado covalentemente en la región de cadena sencilla corta con uno o varios péptidos, proteínas, hidratos de carbono, anticuerpos o esteroides.

45 9. Procedimiento de preparación para vectores que tras su transfección en células eucariotas inhiben de manera selectiva la formación de proteínas definidas mediante interferencia de ARN, **caracterizado por** las siguientes etapas de procedimiento

- 50 a) mezclar una cadena doble de ADN que contiene una copia singular de 19 - 23 bases de longitud de una secuencia génica o su secuencia complementaria inversa así como una señal de terminación para ARN-polimerasas y está terminada mediante un bucle de secuencia de 8-12 bases de longitud en un extremo, que se selecciona de modo que bases opuestas no sean en ningún caso complementarias una con respecto a otra y que las cadenas sencillas de ADN flanqueantes estén unidas entre sí para dar una cadena doble de ADN que en el otro extremo presenta una cadena sencilla de ADN corta que sobresale, con
- 55 b) un oligodesoxinucleótido en forma de horquilla que en su extremo presenta extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen y

- c) una cadena doble de ADN de 10 a 1000 bases (= n) de longitud de una secuencia no codificante con extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen, pudiéndose aparear el extremo 3' monocatenario con el extremo 5' monocatenario del promotor y siendo el extremo 5' monocatenario complementario al extremo 3' monocatenario del oligodesoxinucleótido en forma de horquilla, y
- 5 d) un promotor con extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen, pudiéndose aparear el extremo 5' monocatenario del promotor con el oligodesoxinucleótido en forma de horquilla o la cadena doble de 1,0 a 1000 bases de longitud y siendo el extremo 3' monocatenario del promotor complementario al extremo 5' monocatenario de la cadena doble de ADN descrita en a) y
- 10 e) ligar posteriormente los fragmentos de ADN,
f) así como purificar finalmente los vectores preparados.

10. Procedimiento de preparación para vectores que tras su transfección en células eucariotas inhiben la formación de proteínas definidas de manera selectiva mediante interferencia de ARN, **caracterizado por** las siguientes etapas de procedimiento

- 15 a) mezclar una cadena doble de ADN en forma de T que contiene una copia singular de 19 - 23 bases de longitud de una secuencia génica en dirección 5' - 3' así como una señal de terminación para ARN-polimerasas y porque está terminada mediante un bucle de secuencia de 8 - 12 bases de longitud en un extremo, que se selecciona de modo que bases opuestas no sean en ningún caso complementarias una con respecto a otra y que las regiones de cadena doble flanqueantes estén unidas entre sí así mediante dos cadenas sencillas de ADN y en el otro extremo presenta dos cadenas sencillas de ADN que sobresalen, y un oligodesoxinucleótido
- 20 cuya secuencia es complementaria a las dos cadenas sencillas de ADN cortas que sobresalen y forma dos extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen, con
- b) un oligodesoxinucleótido en forma de horquilla que en el extremo presenta extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen y
- 25 c) otro oligodesoxinucleótido en forma de horquilla que en el extremo presenta extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen, de manera complementaria a la cadena doble de ADN en forma de T de a) y
- d) un promotor con extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen, pudiéndose aparear el extremo 5' monocatenario del promotor con el oligodesoxinucleótido en forma de horquilla de b) y siendo el extremo 3' monocatenario del promotor complementario al extremo 5' monocatenario de la cadena doble de ADN en forma de T y
- 30 e) ligar posteriormente los fragmentos de ADN, así como
f) purificar finalmente los vectores preparados.

11. Procedimiento de preparación según la reivindicación 10, en el que tras la etapa de procedimiento c) se añade una cadena doble de ADN de 10 a 1000 bases (= n) de longitud de una secuencia no codificante con extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen, pudiéndose aparear el extremo 3' monocatenario con el extremo 5' monocatenario del promotor y siendo el extremo 5' monocatenario complementario al extremo 3' monocatenario del oligodesoxinucleótido en forma de horquilla de la etapa de procedimiento b) y/o la adición de una cadena doble de ADN de 10 a 1000 bases (= n) de longitud de una secuencia no codificante con extremos cortos de ADN monocatenario que sobresalen, pudiéndose aparear el extremo 5' monocatenario con el extremo 3' monocatenario de la cadena doble de ADN en forma de T y siendo el extremo 3' monocatenario complementario al extremo 5' monocatenario del oligodesoxinucleótido en forma de horquilla de la etapa de procedimiento c).
- 35
40

12. Procedimiento de preparación según al menos una de las reivindicaciones 9 a 11, en el que al inicio del procedimiento se hibridan oligodesoxinucleótidos monocatenarios parcialmente complementarios uno con respecto a otro para dar una molécula de unión (adaptador), en el que la hibridación se realiza de manera incompleta de tal modo que dos o más regiones bicatenarias con extremos cohesivos con secuencia de bases igual o distinta se unen entre sí mediante uniones Holliday y realización posterior de las etapas de procedimiento indicadas.
- 45

13. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 9 a 12, en el que el promotor es parte de un plásmido que puede amplificarse por vía bacteriana, que antes del mezclado de los componentes respectivos se corta con una endonucleasa de restricción que reconoce un sitio de corte que flanquea al promotor en el plásmido y que no está presente en el constructo de expresión que va a prepararse.

- 50 14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la respectiva etapa de ligación se realiza en presencia de la endonucleasa de restricción con la que se escindió el promotor del plásmido.

15. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que antes de la etapa de purificación final se realiza una digestión de la mezcla de reacción por medio de una exonucleasa específica exclusivamente para extremos de ADN 3' o 5'.

- 55 16. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 13 a 15, en el que en el caso de la endonucleasa de restricción se trata de una enzima del grupo de las endonucleasas de restricción clase II, preferentemente una enzima del grupo BbsI, BbvI, BbvII, BpiI; Bp1I, BsaI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BspMI, Eam1104I, EarI, Echo31I, Esp3I, FokI, HgaI, SfaNI o sus isoesquizómeros.

17. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 9 a 16, en el que durante el mezclado de los componentes se añade una cadena doble de ADN que resulta del apareamiento parcial de un oligodesoxinucleótido parcialmente autocomplementario o al menos dos oligodesoxinucleótidos.
- 5 18. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 9 a 17, en el que los oligodesoxinucleótidos en forma de horquilla presentan en su región bicatenaria la secuencia de reconocimiento para una endonucleasa de restricción.
19. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 9 a 18, en el que la purificación se realiza mediante cromatografía y/o por medio de electroforesis en gel.
- 10 20. Kit para la preparación de un constructo de expresión de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, que contiene al menos oligodesoxinucleótidos adecuados para la formación de estructuras de horquilla de terminación, oligodesoxinucleótidos adecuados para la formación de un adaptador, estructuras de ADN en forma de T en las que pueden insertarse las secuencias que van a transcribirse así como enzimas y medios para la realización de etapas de ligación, escisión, degradación de ADN y purificación.

Fig. 1

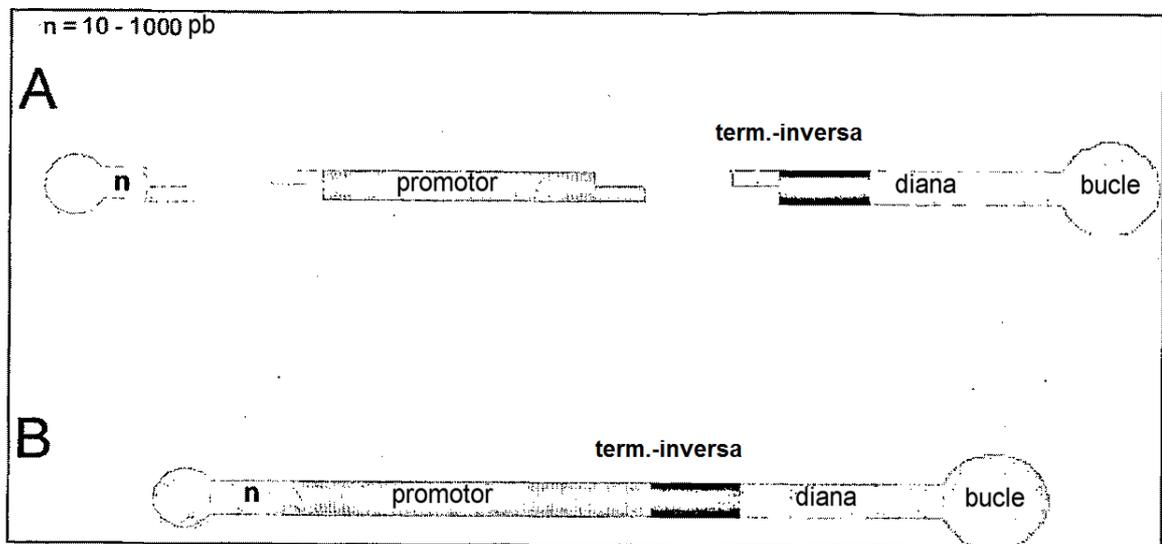


Fig. 2

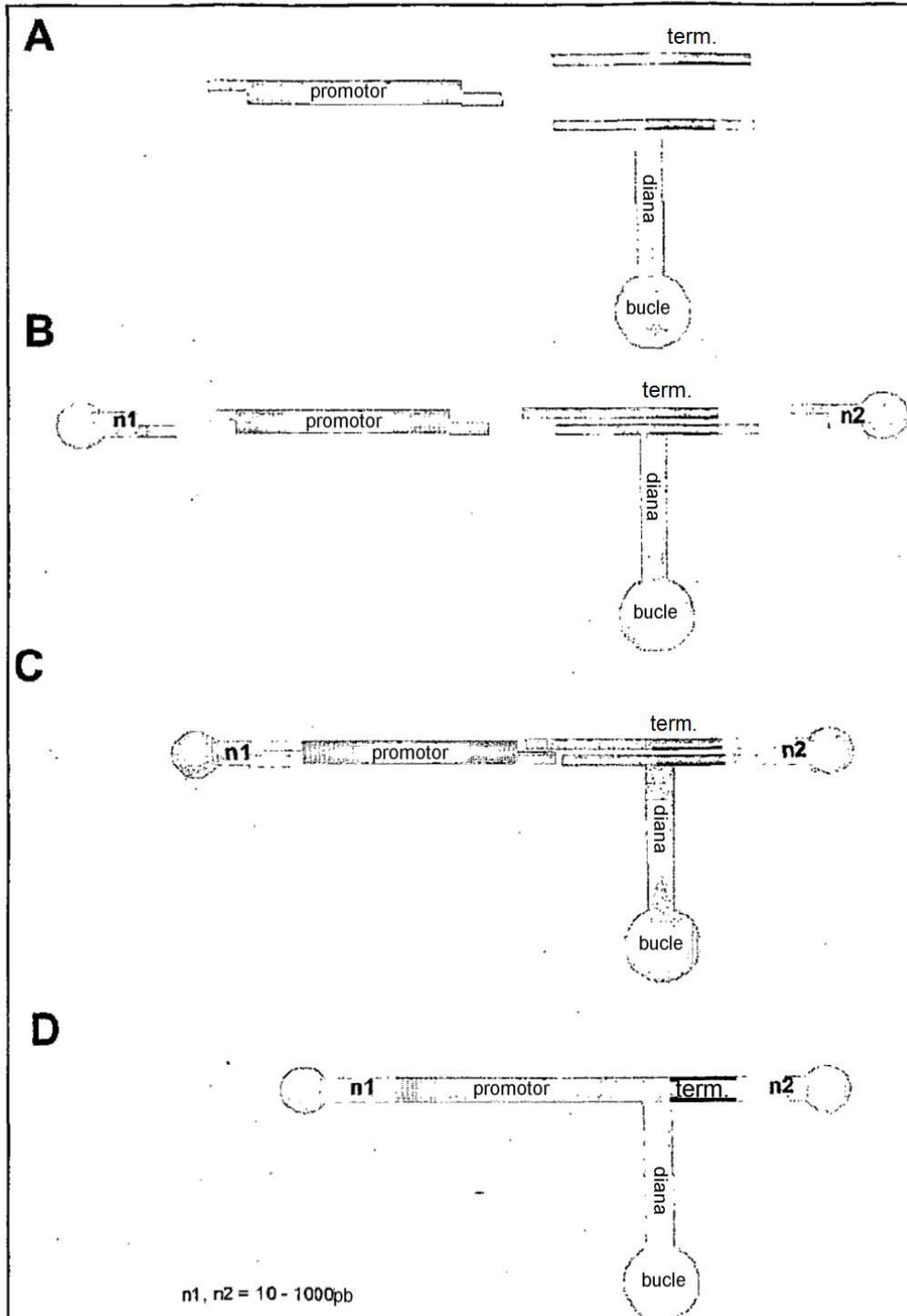


Fig. 3

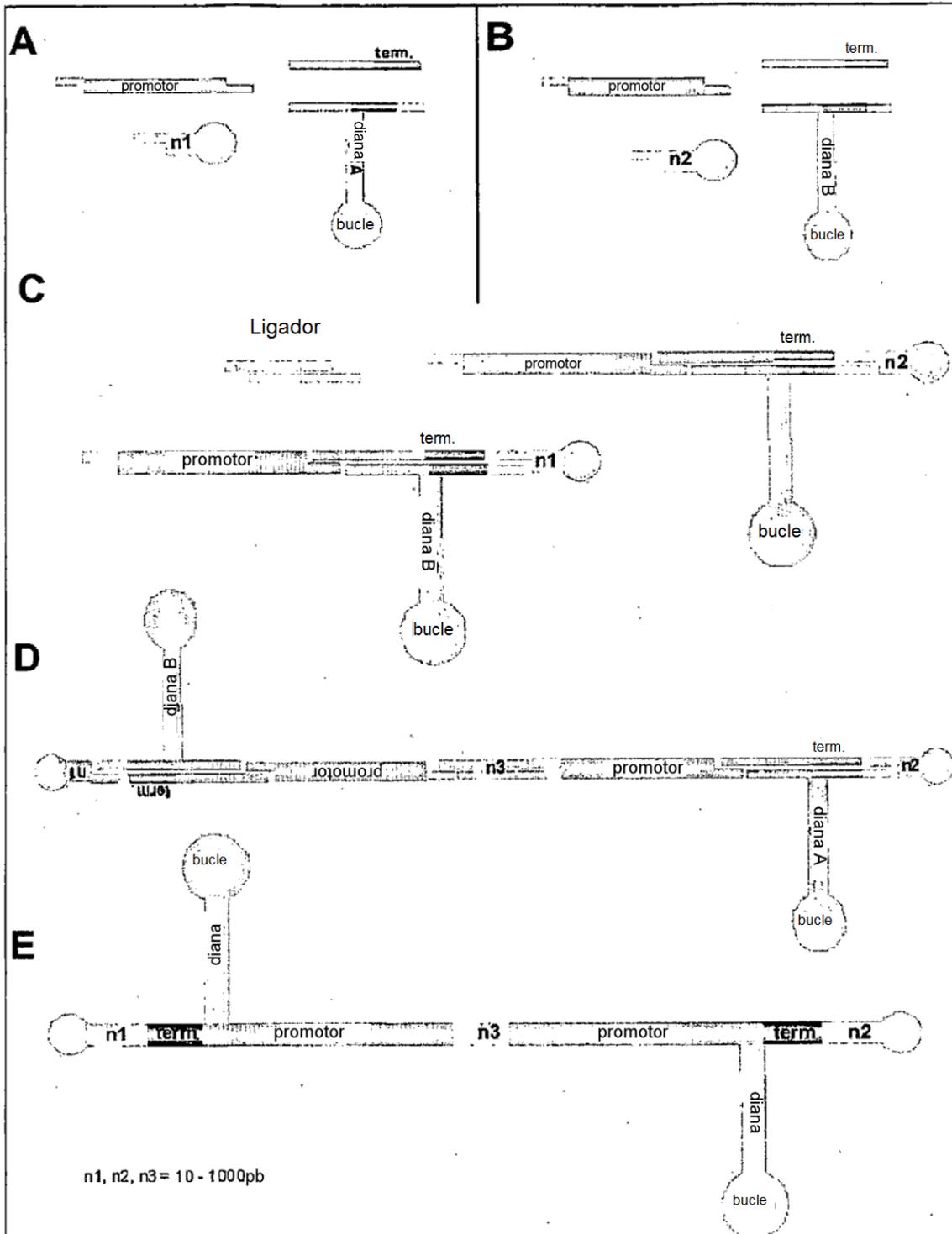


Fig 4.

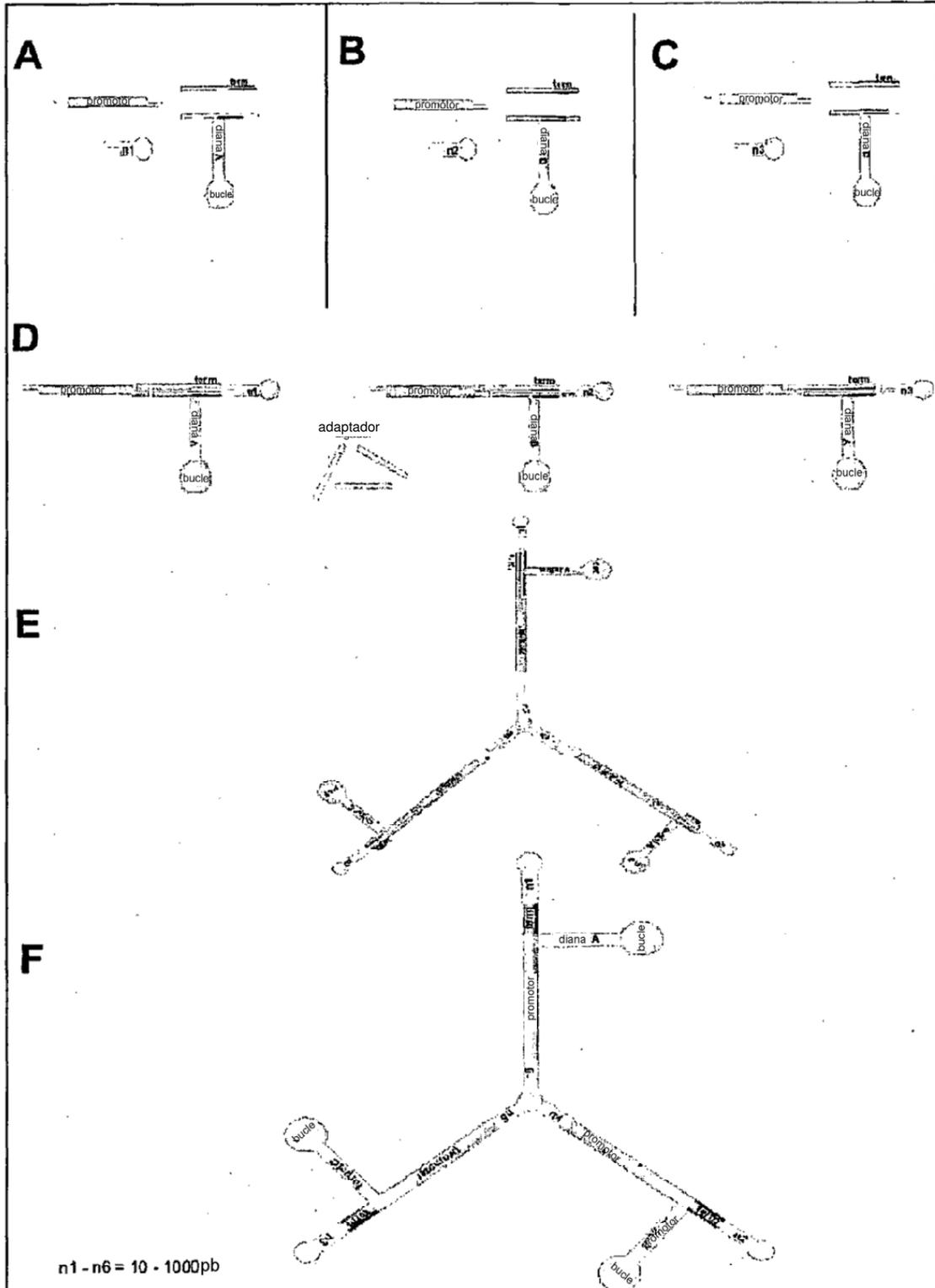


Fig 5

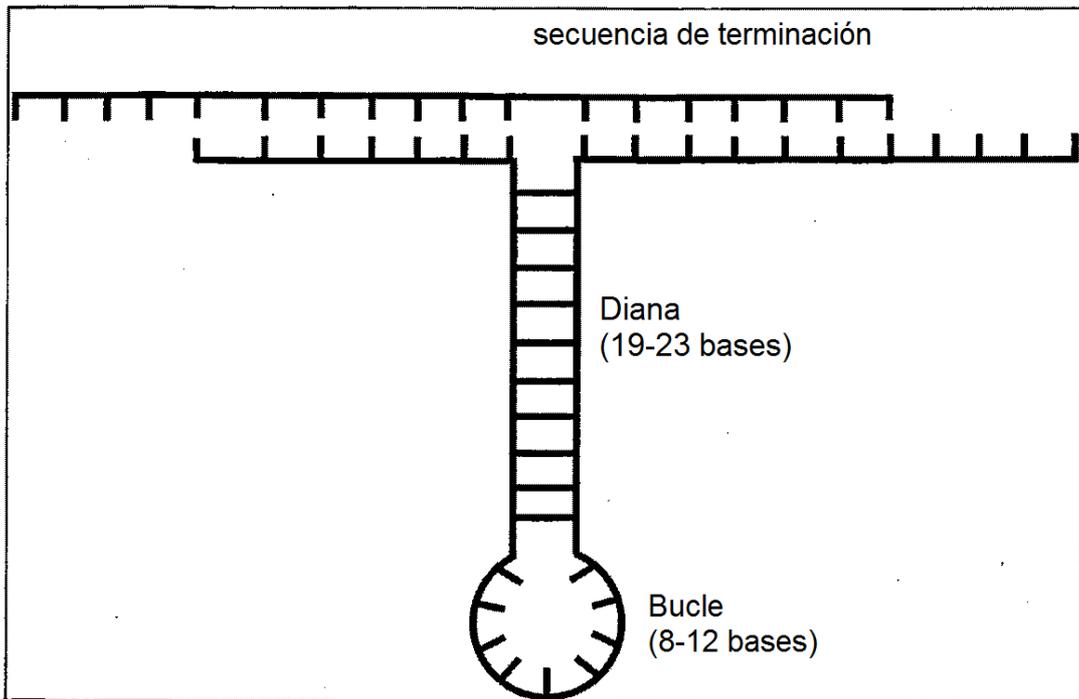


Fig. 6

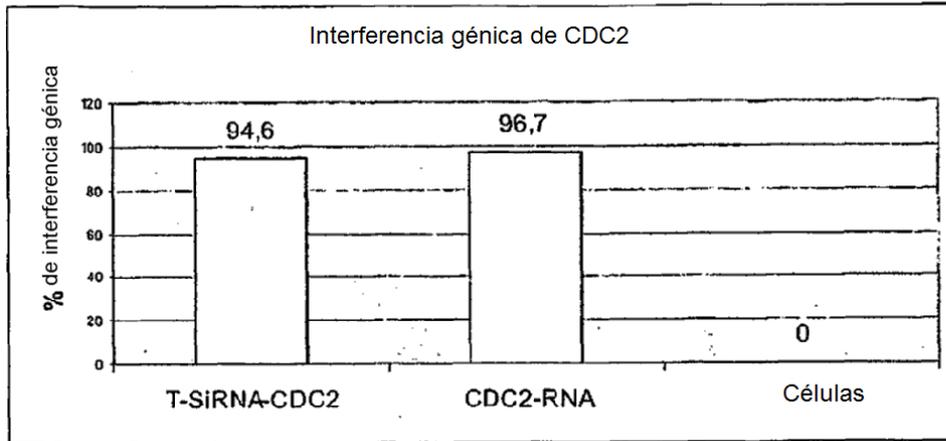


Fig. 7

