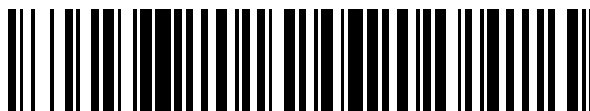


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 192**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2011** **E 11801756 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015** **EP 2655620**

54 Título: **Construcción de expresión de ADN**

30 Prioridad:

23.12.2010 GB 201021873

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

23.10.2015

73 Titular/es:

**MOLOGEN AG (100.0%)
Fabeckstrasse 30
14195 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**SCHROFF, MATTHIAS;
KLEUSS, CHRISTIANE y
KAPP, KERSTIN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 549 192 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

Construcción de expresión de ADN

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a una construcción de expresión génica minimalista, a su transferencia en células y a su uso para la expresión génica en aplicaciones de medicina molecular.

10 **Antecedentes de la invención**

Las construcciones de expresión génica que pueden transferirse al interior de en una célula de interés se están usando frecuentemente para vacunación con ADN, terapia tumoral y prevención. Las construcciones de vectores para estos propósitos han de garantizar la transfección satisfactoria y un máximo de seguridad para el paciente. Las denominadas construcciones basadas en plásmidos de una doble cadena de ADN cerrada circular que se transfieren física o químicamente en células son relativamente seguras. Sin embargo, dependiendo del tipo de célula de interés, la eficacia de la transfección normalmente no es satisfactoria. Por lo tanto, los plásmidos no son aplicables en protocolos clínicos. Además, incluyen normalmente diversas proteínas procariotas (por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos) que se transfieren conjuntamente en la célula. Los promotores procariotas no son absolutamente silenciosos en las células eucariotas lo que puede producir efectos inmunitarios no deseados. El sistema inmunitario del hospedador también puede eliminar las células transfectadas. Adicionalmente, los motivos CG no metilados en los vectores plasmídicos pueden ser inmunostimuladores y justificar al menos alguna de la inmunotoxicidad observada en protocolos de terapia génica.

25 Los vectores retrovirales o adenovirales con replicación defectuosa a menudo se emplean en protocolos clínicos debido a su eficacia de transfección mucho más alta en comparación con los plásmidos. Sin embargo, albergan el riesgo sustancial de recombinación con virus de tipo silvestre o de activación de oncogenes. Además, la necesidad de usar altas titulaciones virales puede producir inflamación.

30 Por lo tanto, el desarrollo de construcciones de expresión génica mejoradas es esencial para superar los efectos secundarios no deseados de los plásmidos y vectores virales. El documento EP 0 941 318 desvela un nuevo tipo de vector, pequeño, lineal, cerrado de manera covalente, con forma de mancuerna, para la expresión génica minimalista, definida inmunológicamente, (MIDGE, *Minimalistic Immunologically Defined Gene Expression*). La MIDGE es una unidad de transferencia génica de tamaño mínimo; solo contiene el mínimo de secuencias necesarias: el casete de expresión, incluyendo el promotor, el gen y la secuencia estabilizadora de ARN, flanqueada por dos secuencias oligonucleotídicas de horquilla pequeña. Además, el diseño de MIDGE proporciona medios para el transporte eficaz en una célula de interés.

40 Las moléculas MIDGE son mucho más pequeñas que los plásmidos o los vectores virales usados convencionalmente y son por tanto más fáciles de transferir al interior de las células y permiten tasas de expresión elevadas. Estas incluyen horquillas cortas en ambos extremos para proteger el casete de expresión contra la degradación por nucleasas.

45 **Breve resumen de la invención**

Con respecto al estado de la técnica es un objetivo de la presente invención proporcionar una construcción de ADN eficaz para la expresión génica en una célula eucariota, que esté protegida contra la degradación por nucleasas.

50 De acuerdo con la divulgación se proporciona una construcción de ADN para la expresión génica, en la que la construcción es una doble cadena de ADN lineal y de cadena abierta que comprende un secuencia promotora, una secuencia codificante y una señal de terminación, en la que la construcción comprende al menos un nucleótido L-ADN en el interior de los cinco últimos nucleótidos de un extremo 5' y/o 3'. También se incluye dentro del ámbito de la presente divulgación una construcción de ADN lineal, parcialmente monocatenario, con forma de mancuerna, que comprende al menos un nucleótido L-ADN.

55 Adicionalmente se proporciona una construcción de ADN, en la que al menos un nucleótido L-ADN se localiza en el extremo 5' y/o 3'. Un bucle monocatenario puede localizarse en el extremo 5' y/o 3', también en combinación con al menos un nucleótido L-ADN, que se localiza dentro de los 5 últimos nucleótidos del extremo 5' y/o 3'.

60 Una construcción de acuerdo con la divulgación puede comprender una cadena de ADN parcial o completamente bicatenaria. Adicionalmente se pretende que al menos un nucleótido L- o D-ADN se modifique con un grupo funcional seleccionado del grupo que comprende grupos carboxilo, amina, amida, aldimina, cetil, acetal, éster, éter, disulfuro, tiol y aldehído.

65 El nucleótido puede unirse a un compuesto seleccionado del grupo que comprende péptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, vesículas, anticuerpos, moléculas sintéticas, polímeros, microproyectiles, partículas metálicas,

nanopartículas o una fase sólida.

Se pretende que una construcción de acuerdo con la presente divulgación comprenda un promotor, que se seleccione del grupo que comprenda secuencias promotoras, que sean operativas en células de seres humanos, de animales o eucariotas. La construcción puede codificar proteínas, péptidos, anticuerpos, hormonas, citocinas u otras sustancias biológicamente activas, tales como ARN inhibidores, reguladores o estimuladores o inmunomoduladores.

Un objeto adicional de la presente divulgación es la construcción de ADN descrita anteriormente para la transfección estable o transitoria de células de seres humanos, de animales o eucariotas así como para terapia génica o vacunación con ADN. La expresión "terapia génica" incluye estrategias *in vivo* o *ex vivo* así como autólogas o alogénicas.

Un objeto adicional de la presente divulgación es la construcción de ADN descrita anteriormente para la vacunación profiláctica o terapéutica contra enfermedades infecciosas o parásitos.

Un objeto adicional es la construcción de ADN de acuerdo con la presente divulgación para el tratamiento de cáncer o de enfermedades autoinmunitarias, opcionalmente junto con el uso de una construcción de ADN inmunomoduladora no codificante.

Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que comprenda una construcción de ADN como la desvelada anteriormente. Dicha composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un agente quimioterapéutico. Como alternativa, puede contener un antígeno adicional de origen bacteriano, fúngico, parasitario o viral.

Descripción detallada de la invención

Dentro del significado de la presente divulgación, una secuencia de ADN lineal, de cadena abierta lineal, se denomina construcción de ADN. Dicha secuencia de ADN puede ser monocatenaria o parcial o completamente bicatenaria. Las expresiones, *construcción de ADN*, *molécula de ADN* y *construcción de expresión* se usan de manera sinónima y no indican una limitación de la longitud de la secuencia de ADN correspondiente. Los componentes monoméricos de las construcciones de ADN son nucleótidos.

Una construcción de ADN puede fabricarse sintéticamente o puede tener un origen parcial o completamente biológico, en el que el origen biológico incluye métodos de fabricación de secuencias de ADN basados en procedimientos genéticos.

El L-ADN o nucleótidos en conformación L se refiere a nucleótidos que comprenden L-desoxirribosa como el resto de azúcar en lugar de la D-desoxirribosa de origen natural. La L-desoxirribosa es el enantiómero (imagen especular) de la D-desoxirribosa. Las construcciones de ADN que consisten, parcial o completamente, en nucleótidos en conformación L pueden ser, parcial o completamente, monocatenarias o bicatenarias; sin embargo, los nucleótidos en conformación L no pueden hibridar con nucleótidos en conformación D (Hauser *et al.*, Nucleic Acid Res. 2006 34: 5101-11). El L-ADN es igualmente soluble y selectivo que el D-ADN. Incluso, el L-ADN es resistente frente a la degradación enzimática por enzimas de origen natural, especialmente exonucleasas, por tanto el L-ADN está protegido contra la degradación biológica (Urata *et al.*, Nucleic Acids Res. 1992 20: 3325-32). Por lo tanto, el L-ADN es muy ampliamente aplicable.

Un "tallo" de acuerdo con la presente divulgación deberá entenderse como una doble cadena de ADN formada por emparejamiento de bases bien dentro de la misma molécula de ADN (que es entonces parcialmente auto-complementaria) o dentro de moléculas de ADN diferentes (que son parcial o completamente auto-complementarias). El emparejamiento de bases intramolecular designa el emparejamiento de bases dentro de la misma molécula de ADN y el emparejamiento de bases entre diferentes moléculas de ADN se denomina emparejamiento de bases intermolecular.

Un "bucle" dentro del significado de la presente divulgación deberá entenderse como una región monocatenaria, no emparejada, bien dentro o en el extremo de una estructura en tallo. Una "horquilla" es una combinación distinta de un tallo y un bucle, que se produce cuando dos regiones auto-complementarias del mismo oligonucleótido se hibridan para formar un tallo con un bucle no emparejado en un extremo.

Una forma de mancuerna describe una construcción de ADN lineal con horquillas en ambos extremos flanqueando una región tallo. Por tanto, una "construcción de ADN lineal" dentro del contexto de la presente divulgación describe bien una construcción de ADN lineal, de cadena abierta, que comprende ADN mono o bicatenario o una construcción de ADN lineal, con forma de mancuerna, que comprende bucles monocatenarios en ambos extremos de un tallo de ADN bicatenario.

Aunque la expresión "extremo de ADN" signifique un extremo 5' o 3' de un cadena sencilla de ADN no solo se refiere al nucleótido terminal, sino que comprende los tres nucleótidos terminales o incluso los cinco últimos nucleótidos con

respecto al extremo de ADN respectivo. Una modificación de un extremo de ADN se refiere a al menos uno de los nucleótidos respectivos.

Una "fase sólida" a la cual se unen los nucleótidos de manera covalente o no covalente, se refiere, pero sin limitación, a una columna, una matriz, perlas, vidrio, incluyendo vidrio modificado o funcionalizado, sílice o materiales basados en sílice, incluyendo silicio y silicio modificado, plásticos (comprendiendo polipropileno, polietileno, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, acrílicos, polibutileno, poliuretanos etc.), nylon o nitrocelulosa, resinas, polisacáridos, carbono así como vidrios inorgánicos y plásticos. Por tanto, las placas de microtitulación también están dentro del ámbito de una fase sólida de acuerdo con la presente divulgación.

La inmunomodulación de acuerdo con la presente divulgación se refiere a inmunestimulación e inmunosupresión. La inmunestimulación significa preferentemente que las células efectoras de sistema inmunitario se estimulan para proliferar, migrar, diferenciarse o activarse en cualquier otra forma. Por ejemplo, la proliferación de células B puede inducirse sin señales co-estimuladoras mediante moléculas de ADN inmunestimuladoras, que normalmente requiere una señal co-estimuladora de células T auxiliares.

Por otro lado, la inmunosupresión deberá entenderse como la reducción de la activación o eficacia del sistema inmunitario. Generalmente, la inmunosupresión se induce deliberadamente para prevenir, por ejemplo, el rechazo de un órgano trasplantado, para tratar la enfermedad de injerto frente a huésped después de un trasplante de médula ósea, o para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como, por ejemplo, artritis reumatoides o enfermedad de Crohn.

En este contexto, la inmunomodulación también puede referirse a la influencia de la naturaleza o del carácter de una reacción inmunitaria, bien afectando a una reacción inmunitaria que está aún desarrollándose o madurando o modulando el carácter de una reacción inmunitaria establecida.

El término "vacunación" usado en esta divulgación se refiere a la administración de material antigénico (una vacuna) para producir inmunidad contra una enfermedad. Las vacunas pueden prevenir o mejorar los efectos de infecciones causadas por muchos patógenos tales como virus, hongos, parásitos, protozoarios, bacterias, pero también de enfermedades alérgicas y asma, así como de tumores. Las vacunas contienen normalmente uno o más adyuvantes, por ejemplo, ácidos nucleicos inmunestimuladores, usados para reforzar la respuesta inmunitaria. Generalmente, se considera que la vacunación es el método más eficaz y rentable de prevención de enfermedades infecciosas y otras enfermedades.

El material administrado puede ser, por ejemplo, formas de patógenos vivos pero debilitados (tales como hongos, bacterias o virus), formas destruidas o inactivadas de estos patógenos, material purificado tal como proteínas, ácidos nucleicos que codifican antígenos, o células tales como células tumorales o células dendríticas. En particular, la vacunación con ADN se ha desarrollado recientemente. La vacunación con ADN funciona por inserción (y expresión, desencadenando el reconocimiento del sistema inmunitario) de ADN que codifica antígenos en células animales o humanas. Algunas células del sistema inmunitario que reconocen a las proteínas expresadas, generarán un ataque contra estas proteínas y contra células que las expresan. Una ventaja de las vacunas de ADN es que son muy fáciles de producir y conservar. Además, las vacunas de ADN tienen diversas ventajas sobre las vacunas convencionales, incluyendo la capacidad de inducir una amplia serie de tipos de respuestas inmunitarias.

La vacunación puede usarse como una estrategia profiláctica, conduciendo a inmunidad contra el antígeno en el individuo sano, vacunado, después de exposición al antígeno. Como alternativa, una vacunación terapéutica puede causar una respuesta mejorada del sistema inmunitario del individuo enfermo, vacunado, guiando al sistema inmunitario del individuo contra los antígenos. La vacunación tanto profiláctica como terapéutica puede aplicarse a seres humanos así como a animales.

La expresión "terapia génica" usada en esta divulgación se refiere a la modificación genética transitoria o permanente (por ejemplo, inserción, alteración, o retirada de agentes) de una célula individual y/o de tejidos biológicos para tratar enfermedades, tales como tumores o enfermedades autoinmunitarias. La forma más común de terapia génica implica la infección de genes funcionales en una localización genómica inespecífica para reemplazar un gen mutado, pero otras formas implican corregir directamente la mutación o modificar un gen normal que permita una infección viral o incluso la transferencia de un gen o un fragmento génico en una célula para su transcripción.

"Terapia génica autóloga" se refiere a usar tejidos o células del propio individuo. Las células o tejidos aislados se modificarán mediante terapia génica y se reintroducirán en el donante. Por otro lado, "terapia génica alogénica" se refiere a usar células para terapia génica de un individuo distinto del individuo receptor. Después de la modificación genética, las células alogénicas se introducen en el acepto.

La expresión "terapia génica *ex-vivo*" se refiere a una estrategia terapéutica en la que las células de un individuo, por ejemplo células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas, se modifican genéticamente *ex vivo* y posteriormente se introducen en el individuo a tratar. La expresión "terapia génica *in-vivo*" se refiere a una estrategia terapéutica en la que las células de un individuo, por ejemplo, células madre hematopoyéticas o células

progenitoras hematopoyéticas, se modifican genéticamente *in vivo*, usando, por ejemplo, vectores virales u otras construcciones de expresión,

5 La terapia génica también puede clasificarse en "terapia génica de línea germinal" y en "terapia génica somática". En caso de "terapia génica de línea germinal", las células germinales, es decir, esperma u ovarios, se modifican genéticamente. Los cambios genéticos se integran normalmente en sus genomas. Por lo tanto, el cambio debido a terapia sería heredable y pasaría a generaciones posteriores. Esta estrategia es útil para el tratamiento de trastornos genéticos y enfermedades hereditarias. En caso de "terapia génica somática", los genes terapéuticos se transfieren al interior de las células somáticas de un individuo. Cualquiera de las modificaciones y efectos estarán limitados solo al individuo y no las heredará la descendencia ni las generaciones posteriores del individuo.

15 El término "cáncer" comprende enfermedades cancerosas o un tumor que se está tratando o previniendo, que se selecciona del grupo que comprende carcinoma mamario, melanoma, neoplasma cutáneo, tumores gastrointestinales, incluyendo carcinomas de colon, carcinomas estomacales, carcinomas pancreáticos, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, carcinomas ováricos, carcinomas de cuello uterino, cáncer pulmonar, cáncer de próstata, carcinoma de células renales y/o metástasis hepáticas.

20 Las enfermedades autoinmunitarias de acuerdo con la presente divulgación comprenden artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, lupus sistémico (SLE), tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis de Hashimoto, esclerosis múltiple, enfermedad de Graves, miastenia grave, enfermedad celiaca y enfermedad de Addison.

25 Las enfermedades infecciosas de acuerdo con la presente invención comprende infecciones causadas por bacterias, virus, hongos o parásitos eucariotas, tales como VIH, Hepatitis, gripe, leishmaniosis, neumonía bacteriana, tuberculosis, sarampión, tos ferina, tétanos, meningitis, sífilis, malaria y cólera, así como enfermedades específicas de animales tales como infecciones por el Virus de la Inmunodeficiencia Felina (VIF), infecciones por el Virus de la Leucemia Felina (VLF), infecciones por el Virus del Herpes Bovino (VHB) y Diarrea viral Bovina.

30 Una construcción de ácido desoxirribonucleico que comprende L-ADN que comprende una unidad de expresión génica mínima, da como resultado una construcción de expresión génica que no se degradará por nucleasas. Los datos experimentales demuestran que dichas construcciones de expresión génica protegidas son adecuadas para realizar una transferencia y expresión génica eficaces en una célula de interés.

35 Las tasas de expresión génica que pueden conseguirse por transfección de construcciones de acuerdo con la presente divulgación son más elevadas que las tasas que pueden conseguirse mediante las moléculas cerradas de manera covalente, como se desvela en el documento EP 0941318 (el vector MIDGE). Se ha demostrado que el vector MIDGE consigue mayores eficacias de transfección así como mejores tasas de expresión que los vectores plasmídicos comparables (Schakowski *et al.*, *in vivo*, 21: 17-24, 2007). Evitando los bucles monocatenarios del documento EP 0941318 la molécula de la presente invención reduce adicionalmente de tamaño lo que facilita la transferencia génica. Debido a las modificaciones del L-ADN, se proporciona estabilidad. De hecho, el uso de enzimas degradadoras de ADN para la retirada de ADN no modificado durante el proceso de producción acentúa esta estabilidad. Ha de observarse que también se incluye en el ámbito de la presente divulgación el proporcionar una construcción de ADN que comprenda L-ADN con al menos una horquilla dispuesta en un extremo de la doble cadena.

45 Para la expresión génica artificial del gen codificado en una célula de interés puede usarse una construcción de ADN de acuerdo con la presente divulgación. En este sentido, la vacunación con ADN, la terapia tumoral y la prevención requieren construcciones de expresión que sean seguras y eficaces para permitir su uso en protocolos clínicos. Las construcciones de expresión convencionales son, por ejemplo, vectores basados en plásmidos. Sin embargo, estos vectores tienen dos desventajas. La primera de ellas es que su eficacia es bastante baja y la segunda es que los vectores basados en plásmidos comprenden diversos genes y elementos genéticos innecesarios para la expresión del polipéptido deseado y por lo tanto corren el riesgo de producir efectos secundarios inmunológicos impredecibles. Mediante una aplicación más prolongada y repetitiva es probable que la respuesta inmunitaria deseada se enmascare por estos efectos secundarios debido a complicaciones graves que puedan surgir.

55 Otras construcciones de expresión del estado de la técnica incluyen vectores retrovirales o adenovirales con replicación defectuosa. Aunque son muy eficaces ya que pueden emplearse para transducir incluso células que no se dividen de una amplia variedad de tipos celulares, corren el riesgo de recombinarse con virus de tipo silvestre y por lo tanto de crear nuevos virus patógenos así como de activar oncogenes. Además, es muy probable que las proteínas virales causen efectos inmunológicos secundarios, especialmente a altas titulaciones.

60 Las unidades de expresión mínimas de las construcciones de expresión de acuerdo con la presente divulgación pueden codificar, pero sin limitación, péptidos presentables por MHC-I o MHC-II, citocinas o componentes de la regulación del ciclo celular, o moléculas de ARN reguladoras y ARN antisentido, ribozimas o moléculas de ARN de edición a ARNm. Además, las construcciones de ADN de acuerdo con la divulgación permiten su adsorción o unión covalente o iónica a, por ejemplo, péptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos o ligandos glucopeptídicos, así como a microproyectiles que permiten la transferencia de las construcciones al interior de las células mediante transferencia

balística, especialmente en la dermis, tejido vascular, páncreas e hígado.

Breve sumario de las figuras

- 5 La divulgación se ilustrará adicionalmente mediante ejemplos y figuras sin limitarse a las realizaciones desveladas. Se muestran las siguientes figuras:
- Fig. 1 Ilustración esquemática de una construcción de ADN de acuerdo con la divulgación
- Fig. 2 Electroforesis en gel de agarosa de construcciones de ADN después de digestión enzimática
- 10 Fig. 3 Eficiencia de transfección usando electroporación de la construcción de L-ADN 2L-M
- Fig. 4 Eficiencia de transfección usando lipofección de la construcción de L-ADN 2L-M
- Fig. 5 Intensidad de fluorescencia que compara las construcciones de expresión L y D-ADN
- Fig. 6 Comparación de eficiencia de transfección usando electroporación de construcciones de L-ADN DL-M y LD-M y el vector MIDGE
- 15 Fig. 7 Inmunización de ratones con MIDGE o L-MIDGE que codifican la proteína pequeña del antígeno de superficie de la Hepatitis B.

Descripción detallada de las figuras

20 La figura 1 muestra una ilustración esquemática de una construcción de ADN (2L-M) de acuerdo con la presente divulgación. Como se indica en la tabla 1 los oligonucleótidos terminales comprenden nucleótidos en conformación L, que se indican mediante recuadros de color gris en la figura 1 en el extremo de la construcción bicatenaria. Por tanto, toda la construcción de ADN está protegida contra degradación por exonucleasas. La construcción representada en la figura 1 no tiene o no necesita tener un bucle en horquilla en ninguno o en ambos extremos para protegerse contra la degradación.

La figura 2 muestra un gel de agarosa de construcciones de ADN que se someten a digestión con la T7-Polimerasa del bacteriófago T7. Se incubaron 6 µg de cada construcción de ADN con 10 unidades de T7-Polimerasa, con un volumen de reacción total de 20 µl. Después de 0, 1, 5, 30, 60 y 1500 minutos, una alícuota de 3 µl de las mezclas de incubación se retiró de la muestra y se diluyó con 5 µl de colorante Sanger que contenía formamida. Todas alícuotas se cargaron en un gel de agarosa al 3 %, que se procesó a 100 Voltios durante 100 minutos.

El carril 1 muestra el vector MIDGE de acuerdo con el documento EP 0 941 318. El carril 2 muestra el casete de expresión no protegido usado para la fabricación del vector MIDGE de acuerdo con el documento EP 0 941 318. El carril 3 muestra la construcción de ADN de acuerdo con la presente invención, con ambos extremos protegidos con L-ADN (denominada posteriormente, "2L-M"). Los carriles 4 y 5 muestran las construcciones de ADN alternativas de acuerdo con la presente invención, con un extremo protegido mediante L-ADN y el otro mediante una horquilla. La construcción de ADN en el carril 4 contiene el extremo protegido mediante L-ADN en el extremo 5' del promotor y una horquilla en el extremo 3', mientras que la construcción del carril 5 está protegida mediante L-ADN en el extremo 3' del promotor, y mediante una horquilla en su extremo 5', respectivamente. Estas construcciones se denominan "DL-M" y "LD-M" (para detalles véase la sección de Ejemplos).

La figura 3 muestra la eficacia de transfección usando electroporación de la construcción de expresión 2L-M que comprende L-ADN de acuerdo con la presente divulgación (2L-M) en comparación con una MIDGE como se desvela en el documento EP 0 941 318 (M), ambas codificando la eGFP. En el lado derecho se muestran los resultados experimentales usando esperma de salmón como control negativo. La barra negra de la izquierda representa el número de células vivas, la barra gris del centro indica el número de células transfectadas y la barra blanca de la derecha muestra el número de células muertas. La línea negra indica el número total de células después de la electroporación.

La eficiencia de transfección de la nueva construcción 2L-M que comprende L-ADN es aproximadamente un tercio más elevada que usando la construcción MIDGE con forma mancuerna. Como se ha mencionado anteriormente, se ha observado que el vector MIDGE posee una mayor eficacia de transfección que las construcciones plasmídicas comparables (Schakowski *et.al.*, *in vivo*, 21: 17-24,2007).

Los resultados no solo demuestran que la construcción de expresión de acuerdo con la presente divulgación es adecuada para la expresión génica, sino también muestran sorprendentemente que la construcción tiene una eficiencia inesperada más elevada en comparación con otras construcciones de expresión. La construcción de expresión desvelada es obviamente lo suficientemente estable como para producir una cantidad considerable de expresión génica y por otro lado la captación o transferencia de la construcción en las células parecen funcionar bastante bien, cuando se usa tanto la electroporación, así como cuando se usa la lipofección.

Para comprobar si los resultados mostrados en la figura 3 están relacionados con la electroporación, cantidades equimolares de MIDGE como se desvela en el documento EP 0 941 318 y de construcciones 2L-M que comprenden L-ADN, se transfirieron al interior de células por lipofección (Figura 4). Como control negativo se usó esperma de salmón. Cada barra blanca muestra el número de células vivas, la barra gris el número de células transfectadas y la

barra negra indica el número de células muertas.

Usando ADN 1,5 µg para lipofección se produce un mayor número de células transfectadas para la construcción de 2L-M con L-ADN de acuerdo con la presente divulgación. Aunque el número de células transfectadas usando ADN 0,5 µg es menor cuando se usa la construcción L-ADN, la intensidad de fluorescencia fue mayor con la construcción L-ADN.

La figura 5 muestra la relación entre la cantidad (masa) de ADN usada para la transfección y la intensidad de fluorescencia media provocada en células individuales. La línea gruesa representa una construcción 2L-M de acuerdo con la invención y la línea de puntos muestra los resultados usando una MIDGE como se desvela en el documento EP 0 941 318.

Para recibir la misma intensidad lumínica ha de aplicarse aproximadamente 30 % más de ADN (masa) de una construcción de ADN con forma de mancuerna, en comparación con la construcción 2L-M desvelada. Por consiguiente, la eficacia en la construcción de ADN de acuerdo con la presente divulgación es sorprendentemente mayor que cuando se usa una construcción con forma de mancuerna.

La figura 6 compara la fluorescencia obtenida de células CHO-K1 que se modificaron con eGFP mediante electroporación usando el vector MIDGE y las construcciones LD-M y DL-M, así como esperma del salmón como control. Sorprendentemente a todas las concentraciones usadas, ambas construcciones DL-M y LD-M podían producir una señal de fluorescencia más elevada de las células, en comparación con el vector MIDGE. Por tanto, las construcciones L-ADN que contenían un extremo L-ADN modificado y una horquilla en D-ADN mostraron sorprendentemente una eficiencia de transfección aumentada en comparación con el vector MIDGE. Claramente, las células captan muy bien estas construcciones y permiten una expresión estable y eficaz, dando como resultado un rendimiento mejorado por los vectores.

Para ensayar la eficacia de las construcciones de expresión desveladas en un modelo animal, se usó una secuencia de ADN que codificaba la proteína pequeña del antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg). En la figura 7 se muestra una representación lineal que muestra diferencias significativas entre grupos de ratones inmunizados con MIDGE y L-MIDGE (en caso de IgG2a, p = 0,033). Usando L-MIDGE como construcción de expresión se producen concentraciones más altas de anticuerpos de IgG que con el uso de MIDGE.

La presente divulgación proporciona una construcción lineal para la expresión génica, que está protegida contra la degradación por nucleasas y es adecuada para la expresión génica eficaz después de la transfección en las células. Fue posible demostrar que los productos génicos resultantes de la transcripción de las construcciones de expresión de acuerdo con la divulgación inducen anticuerpos específicos. Por tanto, se ha comprobado que las construcciones de expresión desveladas son adecuadas para la expresión génica eficaz en células eucariotas.

Ejemplos

Fabricación de construcciones de ADN

La fabricación de las construcciones de ADN de acuerdo con la divulgación se asemeja a la del documento EP 0 941 318. Sin embargo, los oligonucleótidos en horquilla se reemplazan por los denominados "L-adaptadores", como se resume en la Tabla 1. Ambos adaptadores se componen de las moléculas de ADN quiméricas individuales SEC ID Nº 1 y SEC ID Nº 2 (L-adaptador 1) o SEC ID Nº 3 y SEC ID Nº 4 (L-adaptador 2), respectivamente (tabla 1). Los adaptadores se generaron por hibridación de concentraciones equimolares de las moléculas de ADN monocatenario de acuerdo con la tabla 1 a 0,28 mg/ml durante 40 minutos a temperaturas que disminuyen gradualmente de 90 °C a 25 °C en Tris HCl 40 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 0,5 mM (pH 7,8 a 25 °C). Después del ligamiento de ambos adaptadores con el casete de expresión como se sintetiza en el documento EP 0 941 318, se realizó la retirada posterior de D-ADN lineal mediante la T7 polimerasa y la purificación final por HPLC del producto. Esta construcción se denomina "2L-M".

Como alternativa, uno de los L-adaptadores se reemplazó por la horquilla correspondiente, como se usa en el vector MIDGE descrito en el documento EP 0 941 318. Esto dio como resultado construcciones de ADN con una protección L-ADN en un lado del promotor, y una horquilla en el otro lado. Estas construcciones se denominan "DL-M" (L-adaptador 1 y horquilla) y "LD-M" (L-adaptador 2 y horquilla), respectivamente.

Tabla 1: Moléculas de ADN usadas para producción de las construcciones de ADN. Todos los nucleótidos están en conformación D excepto para los nucleótidos indicados

SEC ID	Nombre	Secuencia (5'-3')	Nucleótidos y conformación L
SEC ID Nº 1	CKm364	AGGGGTCCAGTTTTT	14, 15

SEC ID Nº 2	CKm365	AAAAACTGGAC	1, 2
SEC ID Nº 3	CKm362	TTTTTCTAAGCTT	1, 2
SEC ID Nº 4	CKm363	GGGAAAGCTTAGAAAAAT	16, 17
	L-adaptador 1	SEC ID Nº 1 / SEC ID Nº 2	véase anteriormente
	L-adaptador 2	SEC ID Nº 3 / SEC ID Nº 4	véase anteriormente

Transfección

5 Para transferir las construcciones de ADN al interior de las células, pueden emplearse diferentes métodos de transfección, por ejemplo, lipofección o electroporación. La lipofección se realizó de la siguiente manera: 6 x 10⁴ células CHO-K1 se sembraron en una matriz de cultivo tisular de 3,8 cm² y se transfectaron 24 horas después con las cantidades indicadas de ADN que expresaba eGFP mezclando 1:4 con Fugene HD (Roche) y se procesó según indicación del fabricante. Un día después de la transfección, las células se recogieron por tripsinización y se analizaron por fluorescencia mediante citometría de flujo (se contaron 10.000 eventos).

Electroporación

15 La electroporación se realizó de la siguiente manera: 2 x 10⁶ células CHO-K1 se resuspendieron en medio de cultivo 500 µl, se mezclaron con las cantidades indicadas de ADN que expresaba eGFP más 11 µg de esperma de salmón y se pulsaron con 270 V a 1650 µF. Posteriormente, las células se sembraron en matrices de cultivo tisular de 9,5 cm² y se cultivaron. Un día después de la transfección, las células se recogieron por tripsinización y se analizaron por fluorescencia mediante citometría de flujo (se contaron 10.000 eventos).

Inmunización de ratones

20 La secuencia codificante de HBsAg se colocó bajo el control del fuerte promotor viral P_{CMV}. Se produjeron vectores L-MIDGE que codificaban el HBsAg usando los ODN CKm362-365 (compárese la tabla 1), los vectores MIDGE que codifican el HBsAg se produjeron de acuerdo con el documento EP 0 941 318. Ratones Balb/c (6 animales por grupo) se inmunizaron dos veces por vía intradérmica con los vectores L-MIDGE-HBsAg 10 µg/25 ml (8,14 pmol) o con los vectores MIDGE-HBsAg 10 µg/25 ml (8,179 pmol) con una diferencia 3 semanas. Dos semanas después de la segunda inmunización, se obtuvo suero y se analizó mediante ELISA para anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos de HBsAg usando placas ELISA recubiertas con HBsAg (Dade Behring; Enzygnost Anti-HBs II; cat. nº OQNE17 u OQNE11), anti-IgG1 e IgG2a de rata de ratón (BD; cat. nº. 559626 y 553391) como anticuerpos secundarios, anti-IgG2a de HBsAg de ratón (Affinity BioReagents, cat. nº MA1-19264) como patrón y anti-IgG1 de HBsAg de ratón (Affinity BioReagents, cat. nº MA1-19263) como patrón.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> MOLOGEN AG

<120> Construcción de expresión de ADN

40 <130> 80526GB

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

45 <210> 1
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> oligodesoxinucleótido sintético

55 <220>
<221> misc_feature
<223> nucleótidos 14 y 15 en conformación L

<400> 1
 aggggtccag ttttt 16

5 <210> 2
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> oligodesoxinucleótido sintético

15 <220>
 <221> misc_feature
 <223> nucleótidos 1 y 2 en conformación L

20 <400> 2
 aaaaactgga c 11

20 <210> 3
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> oligodesoxinucleótido sintético

30 <220>
 <221> misc_feature
 <223> nucleótidos 1 and 2 en conformación L

<400> 3
 ttttctaag ctt 13

35 <210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> oligodesoxinucleótido sintético

45 <220>
 <221> misc_feature
 <223> nucleótidos 16 y 17 en conformación L

<400> 4
 gggaaagctt agaaaaat 18

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una construcción de ADN para expresión génica, en la que la construcción es una doble cadena de ADN lineal y de cadena abierta que comprende una secuencia promotora, una secuencia de codificación y una señal de terminación, en donde la construcción comprende al menos un nucleótido L-ADN y en la que al menos un nucleótido L-ADN está comprendido en el interior de los cinco últimos nucleótidos de un extremo 5' y/o 3'.
- 10 2. La construcción de acuerdo con la reivindicación 1, en la que al menos un extremo de la construcción de ADN comprende un bucle monocatenario.
- 3 La construcción de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha construcción es parcialmente o completamente bicatenaria.
- 15 4 La construcción de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que al menos un nucleótido L-ADN o D-ADN se modifica con un grupo funcional seleccionado del grupo que comprende grupos carboxilo, amina, amida, aldimina, cetol, acetal, éster, éter, disulfuro, tiol y aldehído.
- 20 5. La construcción de acuerdo con la reivindicación 4, en la que un nucleótido modificado se liga a un compuesto seleccionado del grupo que comprende péptidos, proteínas, carbohidratos, anticuerpos, moléculas sintéticas, polímeros, microproyectiles, partículas metálicas, nanopartículas, lípidos o una fase sólida.
- 25 6. La construcción de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el promotor se selecciona del grupo que comprende secuencias promotoras, que son operativas en células de seres humanos, de animales o eucariotas.
- 30 7. La construcción de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha construcción codifica proteínas, péptidos, anticuerpos, hormonas, citocinas u otras sustancias biológicamente activas.
8. La construcción de acuerdo con la reivindicación 7, en la que las sustancias biológicamente activas son inmunomoduladores.
- 35 9. Una composición farmacéutica que comprende la construcción de ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende adicionalmente un agente quimioterapéutico.
- 40 11. La construcción de ADN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10 para la transfección *in vitro* estable o transitoria de una célula humana, animal o eucariota.
- 12 La construcción de ADN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10 para terapia génica *ex-vivo* o vacunación con ADN.
- 45 13 La construcción de ADN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10 para su uso en un método para el tratamiento de cáncer o de enfermedades autoinmunitarias.
- 50 14. Una combinación de la construcción de ADN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10 con una construcción de ADN inmunomoduladora no codificante.

Figura 1

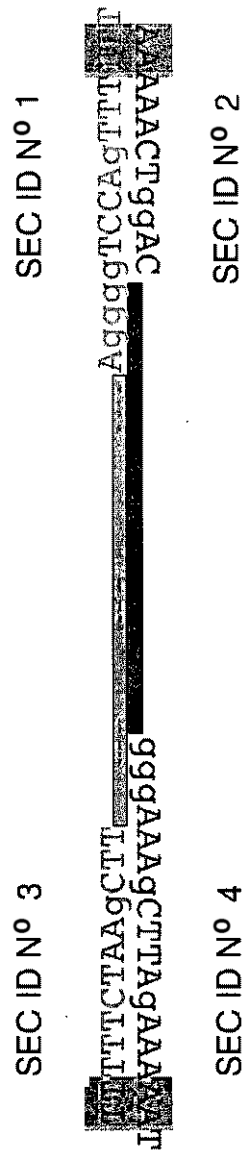


Figura 2

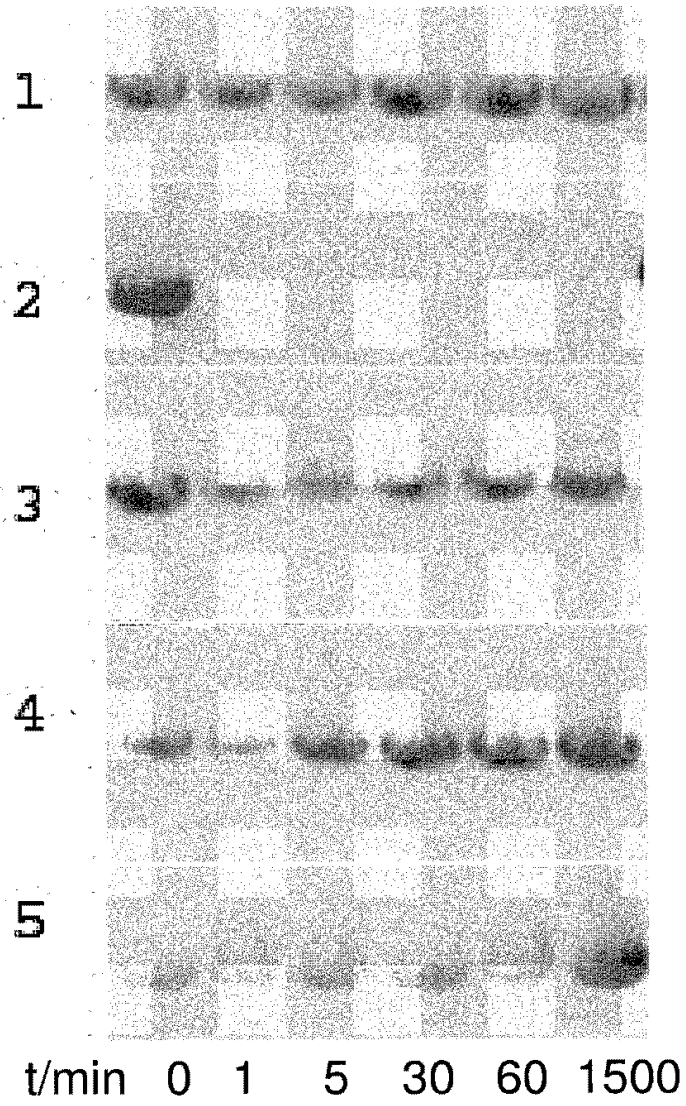


Figura 3

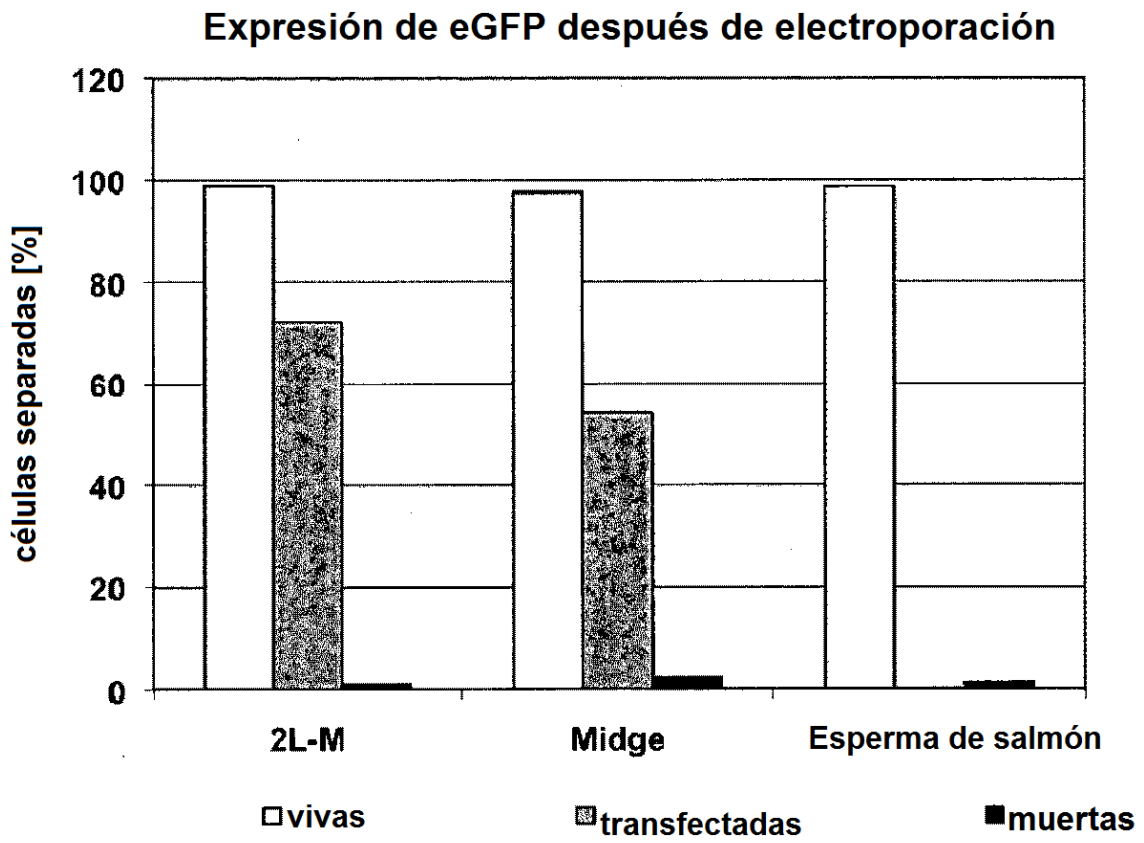


Figura 4

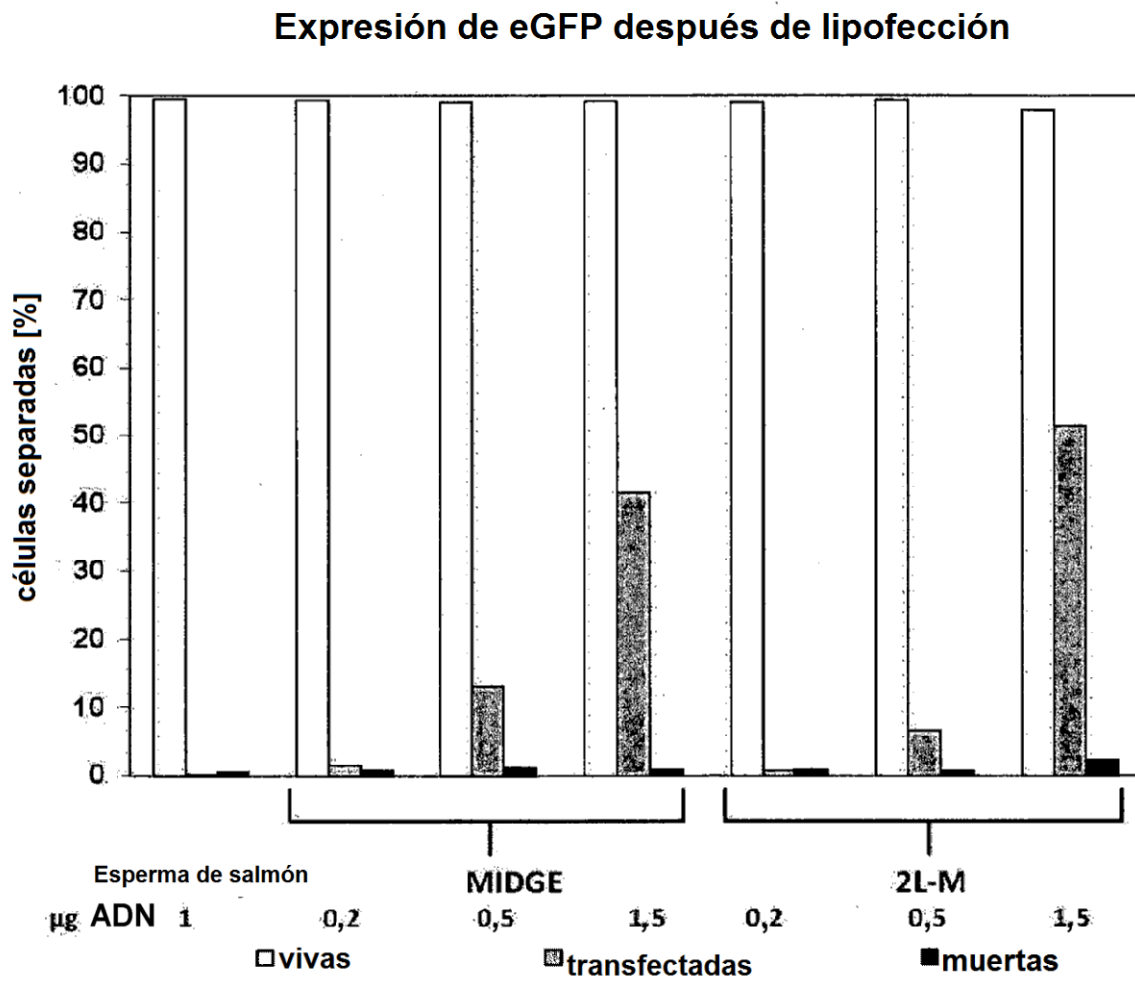


Figura 5

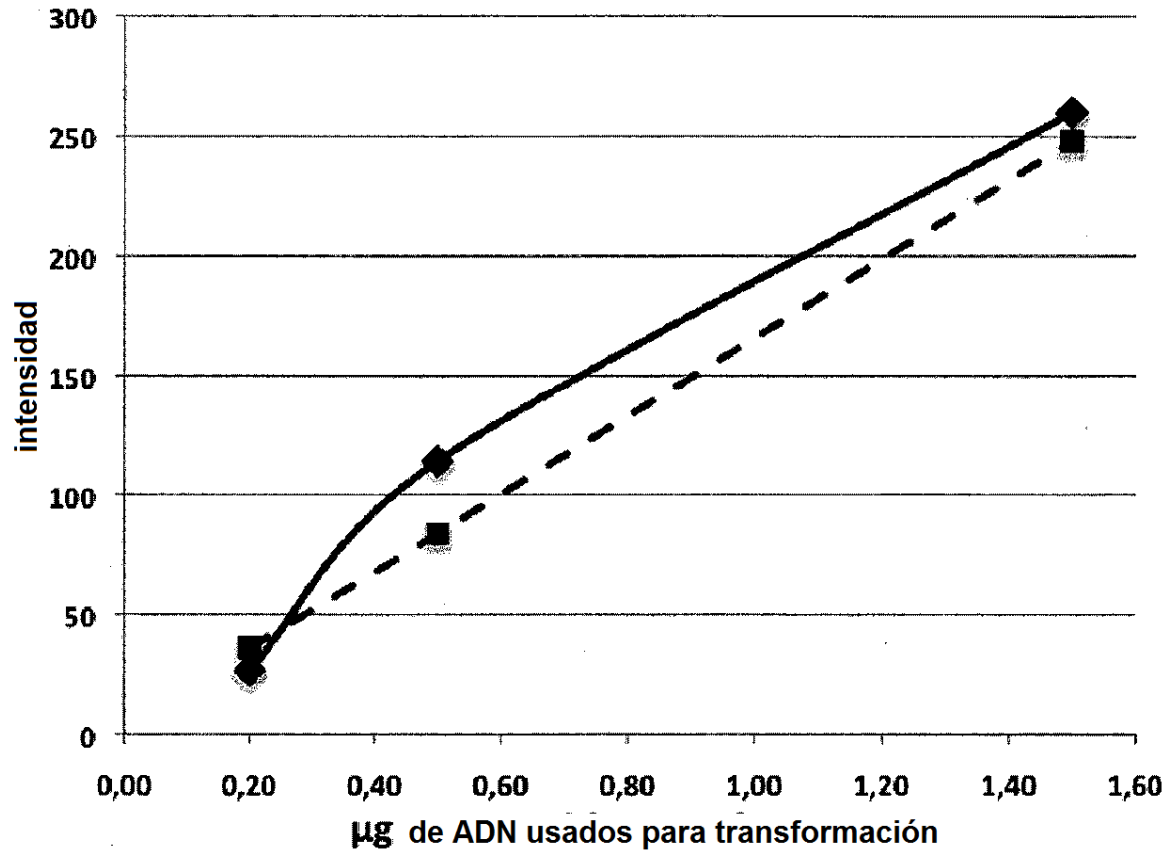


Figura 6

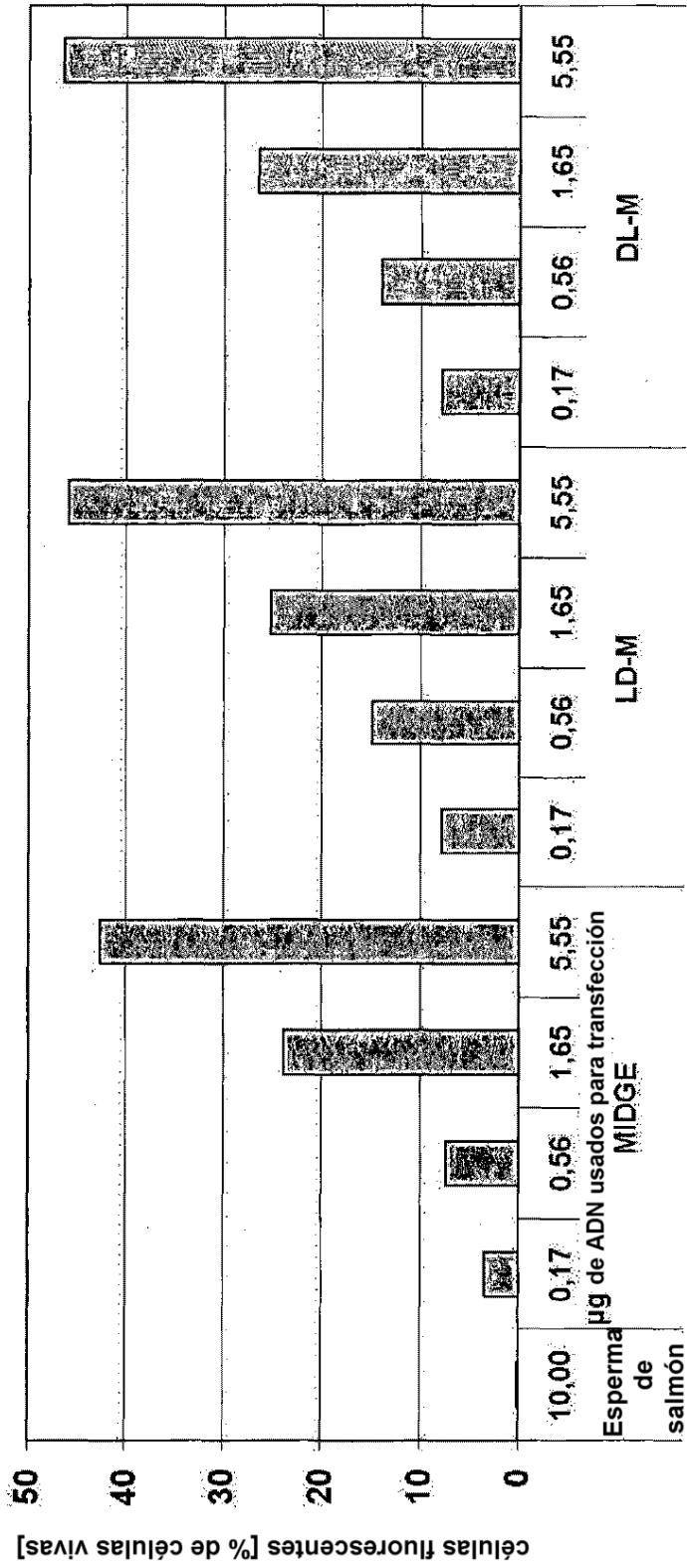


Figura 7

