



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201130782	
Fecha de recepción:	16 mayo 2011, 10:09 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	0208	
Solicitante:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	CONSTRUCCIÓN DE UNA UNIDAD DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE 60-200 NUCLEÓTIDOS EN TAMAÑO	
Documentos enviados:	Descripcion.pdf (18 p.) Reivindicaciones.pdf (2 p.) Dibujos.pdf (4 p.) Resumen.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip OTRO-1.pdf (1 p.) SEQLPDF.pdf (3 p.)	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=NOMBRE UNGRIA LOPEZ JAVIER - NIF 05211582N,OU=500050022,OU=FNMT Clase 2 CA,O=FNMT,C=ES	
Fecha y hora de recepción:	16 mayo 2011, 10:09 (CEST)	
Codificación del envío:	BE:9D:9B:AB:3D:4E:3F:55:04:CC:2C:FC:07:9E:8C:58:C8:27:16:91	

/Madrid, Oficina Receptora/

CONSTRUCCIÓN DE UNA UNIDAD DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE 60-200 NUCLEÓTIDOS EN TAMAÑO.

5

La eficiencia de elementos transponibles en mutagénesis se ve limitada, entre otras causas, por su capacidad de incorporar información marcadora. Este aspecto ha resultado ser crítico en las tecnologías de mutagénesis derivadas del uso de intrones del grupo II. La construcción está constituida por una región con actividad promotora, un espaciador, una región óptima de unión al ribosoma, así como 18 nts que codifican un péptido que confiere una resistencia a antibióticos derivados de macrólidos. Todo ello supone en su conjunto un fragmento de ADN entre 60 y 200 nts que proporciona resistencia a un antibiótico y por tanto permite su aplicación como marcador selectivo en herramientas mutagénicas como son los intrones del grupo II, o en cualquier unidad de ADN que lo contenga.

10
15

CONSTRUCCIÓN DE UNA UNIDAD DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE 60-200 NUCLEÓTIDOS EN TAMAÑO.

La construcción motivo de la siguiente invención supone hasta ahora minimizar la longitud de un gen marcador de resistencia hasta unos 60-200 nucleótidos. Este minigén de resistencia permitiría mejorar el uso en mutagénesis de aquellos elementos transponibles que tienen limitada la capacidad de incorporar información y, por tanto, incrementarían de esta manera su eficiencia en movilidad. Este tipo de eficiencia ha resultado ser crítica, en concreto, en tecnologías derivadas del uso de intrones del grupo II. Con este marcador se supera la limitación actual de este tipo de herramientas de mutagénesis al reducir en más de un 60% el tamaño mínimo utilizado hasta ahora en este tipo de marcadores.

15 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

En 1973 los investigadores Stanley Cohen y Herbert Boyer producen el primer organismo recombinante modificando partes de su ADN, en lo que se considera el comienzo de la ingeniería genética. Ésta se define como la formación in vitro de nuevas combinaciones de material genético mediante la inserción de un ADN de interés en un vehículo genético (vector), de modo que tras su introducción en un organismo (generalmente *Escherichia coli*) el ADN híbrido (recombinante) se pueda multiplicar, propagar, y eventualmente expresarse.

La ingeniería genética se desarrolló de manera exponencial durante los siguientes años incrementando y diversificando el uso de vectores replicativos acompañados de marcadores de resistencia. Desde entonces, han tenido lugar multitud de variaciones que han permitido su desarrollo para distintos usos. A su vez, el número de marcadores de resistencia (generalmente del tamaño de 1 kb) ha sido también amplio y ha desembocado en un uso frecuente en laboratorios para muy diversos fines. Entre otros, la facilidad y el método selectivo derivado de su uso los ha hecho muy adecuados para su aplicación en vectores y sistemas de mutagénesis desarrollados a partir de transposones y sistemas de recombinación homóloga.

Alternativamente a estos métodos de mutagénesis se han venido desarrollando desde hace 5 años métodos de mutagénesis dirigida basados fundamentalmente en dos intrones bacterianos del grupo II: uno desarrollado en intrones que de forma natural no contienen un dominio endonucleasa ejemplificado en RmlInt1 (Patente PCT: ES-200100170/PCT ES02/00030; García-Rodríguez *et al.* 2011) y otro derivado de intrones que, de forma natural, sí contienen este dominio endonucleasa ejemplificado en LI.ltrB.

Tabla 1: Efecto del tamaño de inserto en el dominio IV en la eficiencia de invasión de intrones del grupo II.

Vector	R ^a	Inserción en dIV (en nt)	Mob. Fr. (%) ^b	Intron invasión (%) ^c	Ref.
pACD3 (wt) ^d	-	-	94±2%	ND	(1)
pACD3-RAM	Tm	313	18.8 %	ND	(2)
LI.ltrB donador (wt) ^d	-	-	--	34.4	
LI.ltrB donador pHw+	-	64	--	13.2 (38.4)	
LI.ltrB donador pHw-	-	64	--	12.0 (34.9)	
LI.ltrB donador pHs+	-	79	--	24.0 (69.8)	
LI.ltrB donador pHs-	-	79	--	1.6 (4.7)	(3)
LI.ltrB donador holin/lysin+	-	1180	--	0.3 (0.9)	
LI.ltrB donador pHw/holin/lysin-	-	1244	--	ND	
LI.ltrB donador NaCl-	-	1251	--	ND	
LI.ltrB donador pHs/holin/lysine-	-	1269	--	0.4 (1.2)	
LI.ltrB donador pHs/acmA+	-	1469	--	ND	
Rmlnt1 donador	-	-	100	85.4±3.5	(4)
pKGEMA4(wt) ^d					
Rmlnt1 donador pKGEMA4 T7	-	31	100	63.3±16.1 (74.1)	(5)

^a Fenotipo de resistencia: (-) no resistente (Tm) resistente a Trimetroprima.

^b Frecuencia de células en las que al menos ha habido un evento de salto.

^c Porcentaje de invasión de la diana. Entre paréntesis el valor respecto al vector de referencia sin inserto.

^dVectores de referencia en cada ensayo de movilidad

ND: sin determinar.

De este último ya existe un producto comercial de la firma SIGMA-Aldrich sustentado en 4 patentes internacionales: U.S. Patent Nos. 5,698,421, 5,804,418, 5 6,027,895 and 6,001,608 (Targetrón: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/targetron.html>; Chen, *et al.* 2007). Estos métodos están suponiendo una alternativa a los distintos métodos “clásicos” de generación de mutantes basados en transposones portadores de una unidad de resistencia. La ventaja añadida viene porque permite rediseñarlos para dirigirlos al 10 sitio a mutagenizar y por su independencia de recombinación homóloga.

Los intrones del grupo II desarrollados para la mutagénesis contienen secuencias heterólogas insertadas en el dominio IV del intrón y pueden por tanto ser vehículos potenciales de introducción de un determinado transgén (Nisa-Martínez *et al.* 2007, Chen, *et al.*, 2007). Sin embargo, estudios recientes 15 demuestran que la movilidad de estos elementos se reduce severamente (hasta en 4 órdenes de magnitud; Tabla 1) por inserciones de alrededor de 1 Kb (Plante, & Cousineau 2006, Heap, *et al.*, 2007). Como elementos de mutagénesis dirigida, la incorporación, en los intrones, de marcadores de resistencia que contribuyan a facilitar la selección de los mutantes constituye uno de los aspectos pendientes 20 por desarrollar en esta tecnología. Hasta ahora la unidad más pequeña incorpora un gen de resistencia al antibiótico Trimetroprima, modificado hasta una longitud de 313 nt, reduciéndose la movilidad del intrón a un 20% sobre el silvestre (Tabla 1; Zhong, *et al.* 2003). Por tanto, la búsqueda de unidades de resistencia de un tamaño menor, constituye un paso crítico y supone una importante limitación 25 actual en el desarrollo de estas herramientas de mutagénesis.

En este sentido, Tenson y Mankin determinaron a finales de los 90, que la traducción de pequeños péptidos podía generar una resistencia adquirida del ribosoma a antibióticos macrólidos del tipo Erytromicina (Tenson *et al.*, 1997). Estos péptidos actúan en *cis*, esto es, sobre el ribosoma que los está traduciendo; 30 siendo crítico para generar la resistencia tanto la secuencia, como el tamaño (Tenson & Mankin, 2001). La interacción sobre el ribosoma de estos péptidos parece ser similar a la de los macrólidos del tipo Erytromicina (Tenson & Mankin, 2001)..

El uso de estos minigenes (péptidos de 5 aminoácidos) en el contexto adecuado, p. ej. en los sistemas de mutagénesis basados en los intrones del grupo II, puede generar herramientas útiles de resistencia donde el tamaño de éstas sea crítico.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El objeto de la siguiente invención consiste en la construcción de una molécula de ácido nucleico que contenga una unidad mínima de resistencia a antibióticos que comprende los siguientes pasos:

10

- a) Aportar una secuencia mínima de 18 nucleótidos (minigén) que codifica para un péptido que confiere resistencia a antibióticos o drogas derivadas de macrólidos que comprende pero sin limitarse a Erytromicina, Oleandomicina y Espiramicina..
 - 15 b) Unirla a una secuencia rica en purinas (A, G) correspondiente al sitio de unión al ribosoma que permita una traducción eficiente del péptido mencionado y
 - c) Unirla a una secuencia promotora que permita la transcripción del minigén descrito.
- 20 Todo ello da lugar a una secuencia mínima de unos 60-200 nucleótidos con capacidad de resistencia que pueda ser empleada en cualquier aplicación *in vivo* o *in vitro* y, en particular, en sistemas de mutagénesis o control de la expresión génica derivados del uso de los intrones del grupo II.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- La construcción de una unidad mínima de resistencia a antibióticos, se basa en un fragmento aislado de ADN, que contiene una secuencia de 18 nucleótidos que codifica un péptido de 5 aminoácidos (ATG NNN NNN NNN NNN TGA/TAA/TAG),
- 30 también denominado "minigén". Estudios previos muestran que cualquier mutación que produzca un cambio en el codón de parada elimina la resistencia. Adicionalmente, esta secuencia debe de codificar una Leucina ó Isoleucina en su posición tercera así como un aminoácido hidrofóbico en el último codón, generalmente Valina aunque también puede utilizarse Treonina o Isoleucina

(Tenson, et al. 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 5641–5646).

Junto a esta secuencia de 18 nucleótidos, la construcción debe de contener al menos una secuencia de unión al ribosoma (RBS - una región de 5 nucleótidos con alto contenido en purinas) a una distancia entre 6-9 nucleótidos del codón de iniciación.

Debe existir una región promotora unida a el minigén y la RBS permitiendo así la transcripción de la unidad y su posterior lectura por el ribosoma. Las regiones promotoras más pequeñas en cuanto a número de nucleótidos se refiere se corresponden con las reconocidas por RNA polimerasas de fagos: que comprende pero sin limitarse a T7 (24 nucleótidos), T3 (26 nucleótidos), SP6 (25 nucleótidos),. Por otro lado, otros promotores, tanto inducibles como constitutivos dependientes de la RNA polimerasa de la célula hospedadora pueden asociarse a la unidad de resistencia comprendiendo pero sin limitarse a pSyn (94 nucleótidos), pTacl (67 nucleótidos), pTaclI (68 nucleótidos) pTrp(58 nucleótidos), tic (63 nucleótidos) trc (62 nucleótidos) RecA(62 nucleotidos), pL(35 nucleotidos).

Finalmente, y de manera opcional, terminadores de la transcripción y otros elementos que permitan la estabilidad de este minigén pueden ser incorporados al constructo. Todo ello en su conjunto, con sus posibles variaciones, genera una secuencia entre 60 y 200 nucleótidos que da lugar a un fenotipo de resistencia a macrólidos (que comprende pero sin limitarse a Erytromicina, Oleandomicina y Espiramicina).

Esta molécula de ácido nucleico de resistencia puede ser usada en las distintas aplicaciones mencionadas más adelante y en particular con respecto a su aplicación en tecnologías de mutagénesis derivadas de los intrones del grupo II, supera las dificultades técnicas actuales en tanto que incorpora un marcador de resistencia sobre el intrón mutagénico sin afectar a su movilidad (ejemplos de alguno de los constructos se detallan en las Figuras 1-3; Tabla 2 y Tabla 3).

Tabla 2: Efecto del tamaño de las construcciones conteniendo la secuencia codificante o minigén (Ery^R) insertado en el dominio IV en la eficiencia de invasión del intrón del grupo II Rmlnt1.

Vector	R ^a	Inserción	Mob. Fr.	Intron invasión ^c	Ref.
--------	----------------	-----------	----------	------------------------------	------

		en dIV (en nts)	(%) ^b	(%)	
RmlInt1 donador pKGEMA4(wt) ^d	-	-	100	85.4±3.5	(1)
RmlInt1 donador pKGEMA4 T7	-	31	100	63.3±16.1 (74.1)	(2)
RmlInt1 donador pKG4URE	Ery	198	100	21.9±0.5 (25.6)	

^a Fenotipo de resistencia: (-) no resistente (Ery) resistente a Erytromicina.

^b Frecuencia de células en las que al menos ha habido un evento de salto.

^c Porcentaje de invasión de la diana. Entre paréntesis el valor respecto al vector de referencia sin inserto.

5 ^d Vectores de referencia en cada ensayo de movilidad

(1) Nisa-Martínez *et al.*, 2007. *Nucleic Acids Res.* 35:214-222

(2) García-Rodríguez *et al.*, 2011. *Appl. Environ Microbiol.* 77: 854–861

A este constructo se le pueden añadir sitios de restricción que faciliten su
10 clonación y su uso posterior en otros vectores y/o elementos usados en técnicas
de Ingeniería Genética como los ejemplos que se detallan:

- Uso aplicado a sistemas de mutagénesis basados en transposones. La
mayoría de los sistemas de mutagénesis basados en transposones contienen un
15 gen de resistencia que permite la selección de las células que contengan la
inserción del transposón. Los tamaños actuales están alrededor de 1,2 y 0.9 kb en
gran parte debido al tamaño del gen que confiere la resistencia. La incorporación
de esta unidad de resistencia descrita se podría minimizar el tamaño del
transposón hasta menos de 0,5 kb. Pudiendo tener un interés añadido para
20 completar la “batería” de transposones disponibles en bioingeniería.

- Uso aplicado a minimizar el tamaño actual de plásmidos comerciales.
Reducir el gen de resistencia de un vector a una unidad inferior a los 100 nts
puede suponer ventajas en ese vector derivadas de reducir su tamaño. Por
25 ejemplo para la obtención de secuencias de genotecas utilizando plataformas de
secuenciación masiva (Pirosecuenciación 454, Solexa) donde el minimizar el
tamaño del vector permite un mayor rendimiento en la secuenciación al
corresponder un mayor número de lecturas a los insertos clonados en la
genoteca.

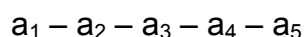
30

- Uso aplicado para etiquetar un determinado gen con un marcador de resistencia

en aplicaciones derivadas de la Reacción de la Polimersa en Cadena (PCR). La longitud de 62 nts lo hace susceptible de formar parte de un oligonucleótido específico que unido a una reacción de amplificación en cadena permite la asociación de este minigén de resistencia a un posible gen, facilitando su clonación posterior o su modificación genética.

La presente invención hace referencia a una molécula de ácido nucleico caracterizada por tener al menos 60-200 nucleótidos y por comprender:

a) al menos una secuencia codificante de al menos 18 nucleótidos o minigen que codifica un péptido con resistencia a drogas derivadas de macrólidos, dicho péptido presenta la siguiente fórmula:



donde a_1 es Met, a_2 es cualquiera de los 20 aminoácidos naturales, a_3 es Leu o Iso, a_4 es cualquiera de los 20 aminoácidos naturales y a_5 se selecciona entre Val, Thr ó Ile,

b) al menos un sitio de unión al ribosoma (RBS), el cual es una secuencia rica en purinas que situada a una distancia entre 6-9 nucleótidos del codón de iniciación (ATG) del péptido citado en a), que permite su traducción y

c) al menos una secuencia promotora reconocida por una RNA polimerasa.

El término: "gen de resistencia a antibióticos" empleado en la presente solicitud hace referencia a aquellos genes que permiten a los microorganismos adquirir resistencia frente a los antibióticos, generalmente mediante 4 mecanismos: inactivación modificación del agente antimicrobiano, alteración del punto de acción, alteración de la ruta metabólica y aumento de la impermeabilidad al antibiótico.

El término: "antibióticos o drogas derivadas de macrólidos" empleado en la presente solicitud comprende pero no se limita a Erytromicina, Oleandomycina, Espiramicina, también hace referencia al grupo de antibióticos muy relacionados entre sí que se caracterizan por tener un anillo macrocíclico de lactona con 14 a 16 miembros. Estos antibióticos o drogas derivados de macrólidos inhiben la síntesis de proteínas mediante la unión a la subunidad ribosomal 50s, inhibiendo la translocación del aminoacil ARNt.

En una realización preferente de la invención la secuencia codificante de al menos 18 nucleótidos que codifica un péptido con resistencia a drogas derivadas de macrólidos citada en a) codifica un péptido con la siguiente secuencia de aminoácidos:

Met-Ser-Leu-Lys-Val.

En una realización aún más preferente de la invención la molécula de ácido nucleico comprende:

10 d) al menos una secuencia promotora inducible o constitutiva dependiente de la RNA polimerasa de la célula hospedadora, que comprende pero no se limita a: pSyn, pTacl, pTacll, pTrp, tic, trc, RecA, y pL.

En otra realización preferente de la invención la secuencia promotora citada en c) es reconocida por una RNA polimerasa de un fago, el cual preferentemente se puede seleccionar entre: T7, T3, y SP6.

Otra realización más preferente de la invención hace referencia a la secuencia codificante de al menos 18 nucleótidos que codifica un péptido con resistencia a drogas derivadas de macrólidos, preferentemente Erytromicina, Oleandomicina y Espiramicina, citada en a) está total o parcialmente modificada mediante sustituciones nucleotídicas simples (un nucleótido) o superiores, deleciones o inserciones.

25 Otra realización más preferente de la invención hace referencia al sitio de unión al ribosoma (RBS) citado en b) y sus distancias al codón de iniciación están total o parcialmente modificadas mediante sustituciones nucleotídicas simples (un nucleótido) o superiores, deleciones o inserciones.

30 Otra realización más preferente de la invención hace referencia a la secuencia promotora citada en c) es total o parcialmente modificada mediante sustituciones nucleotídicas simples (un nucleótido) o superiores, deleciones o inserciones.

Otra realización más preferente de la invención hace referencia a la secuencia promotora citada en c) es total o parcialmente modificada mediante sustituciones nucleotídicas simples (un nucleótido) o superiores, deleciones o inserciones.

- 5 Otra realización más preferente de la invención hace referencia a la secuencia codificante de al menos 18 nucleótidos que codifica un péptido con resistencia a drogas derivadas de macrólidos citada en a), el sitio de unión al ribosoma (RBS) citado en b) y la secuencia promotora citada en c) están total o parcialmente modificadas mediante sustituciones nucleotídicas simples (un nucleótido) o
- 10 superiores, deleciones o inserciones.

La presente invención también tiene como objeto de protección el uso de la molécula de ácido nucleico definida anteriormente en un proceso de mutagénesis que incluya tecnología derivada de transposones ó tecnología derivada de

15 Intrones del grupo II.

El término: "elementos móviles o transposones" empleado en la presente solicitud hace referencia a aquellas secuencias de ADN que pueden moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula. Según su

20 mecanismo se clasifican en dos clases: Clase I o retrotransposones: se mueven en el genoma siendo transcritos a ARN y después en ADN por retrotranscriptasa. Clase II o DNA transposones: se mueven directamente de una posición a otra en el genoma sin transcribirse a ARN.

25 El término: "intrones del grupo II" empleado en la presente solicitud hace referencia a aquellos RNAs catalíticos (RNAs con actividad enzimática, Ribozimas) mayores de 500 nts constituidos por 6 dominios estructurales, precursores de los intrones del "spliceosoma" eucariótico y que poseen movilidad via RNA.

30

En una realización más preferente, la presente invención hace referencia al uso de la molécula de ácido nucleico definida anteriormente para la obtención de un Vector de Clonación.

En una realización aún más preferente de la presente invención, se hace referencia al uso de la molécula de ácido nucleico definida anteriormente en el etiquetado de un fragmento de ADN mediante la Amplificación en Cadena de la Polimerasa (PCR).

5

El término: "intrón mutagénico" empleado en la presente solicitud hace referencia a aquellos intrones del grupo II capaces de ser redirigidos a cualquier diana.

El término: "minigén" empleado en la presente solicitud hace referencia a una
10 secuencia lineal organizada de nucleótidos en la molécula de ADN que contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula, en este caso un péptido de 5 aminoácidos, con función celular específica.

El término: "movilidad en Intrones, eficiencia de invasión y frecuencia de invasión"
15 empleado en la presente solicitud hace referencia a un parámetro de movilidad de Intrones del grupo II que indica el porcentaje de invasión por un intrón dado del ADN diana (eficiencia de invasión) y un parámetro de movilidad de Intrones del grupo II que indica el porcentaje de células en un cultivo en las que al menos ha habido un evento de salto (frecuencia de invasión).

20

El término: "plataformas de secuenciación masiva" empleado en la presente solicitud hace referencia a aquellos nuevos métodos para la determinación de secuencia de ADN a gran escala, aplicable a genomas completos, mediante luminiscencia. Permiten determinar la secuencia de hasta 20 millones de bases
25 en horas, lo cual abarata enormemente el coste del proceso y se están implementando a nivel Mundial.

El término: "región promotora" empleado en la presente solicitud hace referencia a aquella región que permite la transcripción de una secuencia nucleotídica y su
30 posterior lectura por el ribosoma. La expresión "región promotora" también hace referencia a aquellas regiones promotoras más pequeñas en cuanto a número de nucleótidos se refiere que corresponden con las reconocidas por RNA polimerasas de fagos, entre las cuales se encuentran T7 (24 nucleótidos), T3 (26 nucleótidos), SP6 (25 nucleótidos), y otras conocidas por un experto en la

materia. Tanto inducibles como constitutivas dependientes de la RNA polimerasa de la célula hospedadora, entre las cuales se encuentran pSyn, pTacI, pTacII, pTrp, tic, trc, RecA y pL.

- 5 El término: "secuencia de unión al ribosoma (RBS):" empleado en la presente solicitud hace referencia a aquella secuencia de nucleótidos situada unos 6 ó 7 nucleótidos antes del codón de inicio de la traducción, generalmente rica en purinas (A,G) y que facilita el posicionamiento del ribosoma para el comienzo de la traducción del ARN mensajero

10

El término: "sistemas de mutagénesis basados en transposones" empleado en la presente solicitud hace referencia a aquellos sistemas de generación de mutaciones en un ADN dado (Genoma bacteriano o eucariota) basados en la utilización de maquinaria derivada de transposones eficientes que virtualmente se insertan en cualquier sitio de ese genoma.

- El término: "sistemas de Mutagénesis por Recombinación Homóloga" empleado en la presente solicitud hace referencia a aquellos sistemas que se basan en eventos de recombinación entre un ADN genómico clonado y su locus en el cromosoma.
- 20 La rotura del gen puede suceder mediante inserción completa del plásmido (via "single crossing over") o por intercambio del locus cromosómico por el alelo contenido en el plásmido (via "double crossing over").

- El término: "terminadores de la transcripción" empleado en la presente solicitud hace referencia a aquellas secuencia de nucleótidos que al ser transcritas hacen que la transcripción se detenga. Estas secuencias son ricas en Guanina y Citosina, situadas en el extremo final de los genes, seguidas de secuencias ricas en Timina, formando secuencias palindrómicas, que cuando se transcriben el ARN recién sintetizado adopta una estructura en horquilla que desestabiliza el complejo ARN-ADN, obligando a separarse de la ARN polimerasa
- 25
- 30

El término: "URE" empleado en la presente solicitud hace referencia a un Oligonucleótido conteniendo la Unidad de Resistencia al macrólido Eritromicina. Constituido por Promotor, RBS ORF del péptido y Terminador.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Primer ejemplo: PT7. representación esquemática de una unidad mínima funcional de Resistencia. Constituida por: Promotor de T7 (18 nucleótidos), espaciador (6 nucleótidos), SD (7 nucleótidos.), espaciador (8 nucleótidos), gen resist. Ery (15 nucleótidos + STOP). –Tamaño total: 62 nucleótidos.

Figura 2. Segundo ejemplo: SUS representación esquemática de una unidad mínima funcional de Resistencia. Constituida por: Promotor Syn (55 nucleótidos), espaciador (6 nucleótidos), SD (7 nucleótidos), espaciador (8 nucleótidos), gen resist. Ery (15 nucleótidos + STOP). –Tamaño total: 104 nucleótidos.

Figura 3. Tercer ejemplo: URE representación esquemática de una unidad mínima funcional de Resistencia. Constituida por: Promotor de T7 (18 nucleótidos), espaciador (47 nucleótidos), SD(7 nucleótidos), espaciador (8 nucleótidos), Gen resist. Ery (15 nucleótidos + STOP), espaciador (52 nucleótidos) y Terminador de T7 (48 nucleótidos). Tamaño total: 198 nucleótidos.

Figura 4. Eficiencia de movilidad de Rmlnt1 y sus derivados Δ ORF. A. Configuraciones genéticas de las construcciones donadoras. Pkm, promotor del gen de resistencia a kanamicina; B, BamHI; Sp, SpeI; S, SacI. En la parte derecha se muestra la predicción de la estructura secundaria del Dominio IV. Se muestran los codones de inicio y parada de la secuencia codificante de la IEP y mediante líneas se demarca la delección interna (Δ ORF). Los subdominios DIVa y DIVb están indicados. B. Ensayos de homing in vivo. El ADN plasmídico de células de RMO17 co-transformadas con los distintos plásmidos donadores y receptores (pJB0.6LEAD o pJB0.6LAG) fueron analizados por hibridación ADN-ADN con una sonda específica de la secuencia de inserción ISRm2011-2 que reconoce principalmente los plásmidos donadores con exones largos, los plásmidos receptores y los productos de homing. La proporción de invasión en cada ensayo de homing se representa en la parte inferior de la figura.

Figura 5. Comparación de crecimiento en placa entre células de *E. coli*

conteniendo pET3a y pETURE en presencia de Eritromicina 100µg/ml

BIBLIOGRAFÍA

- Chen, Y., Caruso, L., McClane, B., Fisher, D., Gupta, P. (2007). Disruption of a toxin gene by introduction of a foreign gene into the chromosome of *Clostridium* 5 *perfringens* using targetron-induced mutagenesis. *Plasmid* 58: 182-9.
- García-Rodríguez FM, Barrientos-Durán A, Díaz-Prado V, Fernández-López M, Toro N. (2011) Use of Rmlnt1, a group IIB intron lacking the intron-encoded protein endonuclease domain, in gene targeting. *Appl Environ Microbiol.* 77:854-861.
- 10 - Guo H, Karberg M, Long M, Jones JP 3rd, Sullenger B, Lambowitz AM. 2000 Group II introns designed to insert into therapeutically relevant DNA target sites in human cells. *Science* 289: 452-457.
- Heap, J.T., Pennington, O.J., Cartman, S.T., Carter, G.P., Minton, N.P. (2007). The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus 15 *Clostridium*. *J.Microbiol.Methods* 70: 452–64.
- Nisa-Martínez R, Jiménez-Zurdo JI, Martínez-Abarca F, Muñoz-Adelantado E, Toro N. (2007) Dispersion of the Rmlnt1 group II intron in the *Sinorhizobium meliloti* genome upon acquisition by conjugative transfer. *Nucleic Acids Res.*35:214-222
- 20 - Plante, I., Cousineau, B., (2006). Restriction for gene insertion within the *Lactococcus lactis* LI.LtrB group II intron. *RNA* 12: 1980–1992.
- Tenson, T. and Mankin, A.S. (2001) Short peptides conferring resistance to macrolide antibiotics. *Peptides* 22: 1661–166
- Tenson, T., Xiong, L., Kloss, P. and Mankin, A.S. (1997) Erythromycin 25 Resistance Peptides Selected from Random Peptide Libraries. *JBC* 272: 17425–30.
- Zhong, J., Karberg, M. and Lambowitz AM (2003) Targeted and random bacterial gene disruption using a group II intron (targetron) vector containing a retrotransposition-activated selectable marker. *NAR* 31: 1656-64.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de
5 patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos
se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como
limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos
descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de
la misma.

10

El uso de las moléculas de ácido nucleico objeto de la presente invención
comprendiendo estos minigenes (péptidos de 5 aminoácidos) en el contexto
adecuado, puede generar herramientas útiles de resistencia a antibióticos de tipo
macrólido donde el tamaño de éstas sea crítico.

15

Ejemplo 1. Uso aplicado a sistemas de mutagénesis basados en los intrones del grupo II.

La unidad de resistencia mínima se incorpora al dominio IV (DIV) de un intrón del
grupo II utilizado como vector de mutagénesis (Rmlnt1). Transfiriendo de esta
20 manera la resistencia al lugar de inserción.

1.1 Introducción

Los intrones del grupo II son RNAs catalíticos y, a su vez, retroelementos móviles
25 de los que pueden derivarse herramientas para una mutagénesis dirigida (Guo et
al. 2000). La incorporación de marcadores de resistencia en la secuencia de estos
retroelementos permitiría la selección de eventos de movilidad. Sin embargo,
existen datos de que un tamaño excesivo de la secuencia que se introduce tiene
un efecto negativo en la frecuencia de movilidad de este tipo de elementos
30 móviles (Zhong *et al.* 2003) por lo que estos marcadores deben tener el menor
tamaño posible. Por ello se ha propuesto en el estado de la técnica la utilización
de un minigén cuya secuencia codifica un pentapéptido que confiere resistencia a
antibióticos de tipo macrólidos (Tenson *et al.*, 1997).

1.2 Resultados y Discusión

1.2.1 Modificación de construcciones donadoras del intrón Rmlnt1 para mejorar su movilidad.

5 En el estado de la técnica se ha demostrado que el intrón Rmlnt1 mejora su movilidad tras la eliminación de la mayoría de la secuencia codificante de la proteína que se encuentra codificada en el bucle terminal del DIV (derivados Δ ORF) y con el acortamiento de los exones hasta posiciones -20/+5 (Nisa-Martínez *et al.* 2007; Figura 4).

10

Estas modificaciones permitieron llegar a una eficiencia de invasión de un 90% (Fig. 4B). Este incremento en la eficiencia de *homing* se vio mejorado con la combinación de intrón Δ ORF y exones cortos dando lugar a niveles de invasión del intrón cercanos al 100%. Teniendo en cuenta todos estos datos la presente
 15 invención presenta construcciones Δ ORF flanqueadas por exones cortos (-20/+5) y que expresan la proteína codificada por el intrón (IEP) en *cis* dentro del mismo transcrito precursor dicha configuración es eficiente para la generación de herramientas de mutagénesis dirigida.

20 1.2.2 La Unidad de Resistencia a Eritromicina (URE).

Con objeto de desarrollar un constructo donde probar los límites en la resistencia al antibiótico, la secuencia codificante del pentapéptido (18 nt) que confiere resistencia a eritromicina se introdujo mediante PCR inversa en el vector pET3a (pET-System de New England Biolabs company). El minigen se expresa
 25 desde el promotor de la T7 RNA polimerasa y bajo la influencia del sitio de unión al ribosoma (RBS) presentes en el vector pET3a quedando generada la unidad U.R.E. Con el plásmido generado (denominado pETURE) se testó su capacidad para conferir resistencia a Eritromicina (Fig. 5). Mediante curvas a concentraciones crecientes de Eritromicina, en placas de cultivo con medio LB
 30 suplementado con los antibióticos Ampicilina y Eritromicina, e IPTG 75 μ M se determinó que el pentapéptido confería resistencia a eritromicina a concentraciones de 100 μ g/L (Figura 5). Esta concentración es varios órdenes de magnitud superior a la sensibilidad de *E. coli* a este antibiótico, por lo que se puede concluir que 198 nt (Figura 3) confieren resistencia a Eritromicina..

1.2.3 Análisis de la movilidad de construcciones donadoras que incorporen la Unidad de Resistencia a Eritromicina (URE).

Una vez definida y demostrada la unidad de resistencia a un inserto de 198 nt (ver figura 3), ésta se introdujo mediante clonación por enzimas de restricción en la secuencia del dominio IV del RNA del intrón en construcciones Δ ORF optimizadas en el apartado anterior generando distintos constructos:

- 1) pKG4URE, derivado del donador de intron pKGEMA4 (Nisa-Martinez et al 2007) donde la unidad URE se ha insertado en sentido contrario al intrón.
- 2) pKG4acURE, derivado de pKG4ac (Nisa-Martinez et al 2007) donde la unidad URE se ha insertado en el mismo sentido que el intrón.
- 3) pKG4acSUST: derivado de pKG4ac (Nisa-Martinez et al 2007) donde la unidad URE bajo un nuevo promotor (PSyn; ver figura 2).se ha insertado en el mismo sentido que el intrón. En este constructo además se ha eliminado el terminador de la transcripción.

Tabla 3: Efecto del tamaño de las construcciones conteniendo el minigén (Ery^R) insertado en el dominio IV en la eficiencia de invasión del intrón del grupo II Rmlnt1.

Vector	R ^a	Inserción en dIV (en nts)	Mov. Fr. (%) ^b	Intron invasión ^c (%)	Ref.
Rmlnt1 donador pKGEMA4(wt) ^d	-	-	100	85.4 \pm 3.5	(1)
Rmlnt1 donador pKG4URE	Ery	198	100	21.9 \pm 0.5 (25.6)	
Rmlnt1 donador pKG4ac(wt) ^d	-	-	100	68.5 \pm 4.1	(1)
Rmlnt1 donador pKG4acURE	Ery	198	100	15.5 \pm 2.1 (22.6)	
Rmlnt1 donador pKG4acSUST	Ery	137	100	8.4 \pm 1.5 (12.3)	

^a Fenotipo de resistencia: (-) no resistente (Ery) resistente a Erytromicina.

^b Frecuencia de células en las que al menos ha habido un evento de salto.

^c Porcentaje de invasión de la diana. Entre paréntesis el valor respecto al vector de referencia sin inserto.

^d Vectores de referencia en cada ensayo de movilidad

(1) Nisa-Martínez *et al.*, 2007. Nucleic Acids Res.35:214-222.

Con las construcciones generadas se llevó a cabo el análisis de su movilidad (Tabla 3). Se observa que, en el caso del donador pKG4URE (con la unidad URE

insertada en sentido contrario al intrón) se detectan los eventos de salto, aunque bien es cierto, que en los datos obtenidos se observa que aunque la eficiencia de invasión se ve reducida respecto al donador silvestre pKGEMA4; la frecuencia de estos eventos permanece inalterada (Tabla 3). Otras construcciones, donde se ha
5 cambiado bien el contexto de la ribozima (pKG4acURE), o bien se ha sustituido la región promotora (pKG4acSUST) mostraron igualmente inalterada la frecuencia de invasión y reducida, pero claramente detectable, la eficiencia de invasión a valores entre 5 o 10 veces inferiores a la mostrada por el intrón sin inserto (Tabla 3).

10 Por otro lado, las construcciones derivadas de la movilidad de Rmlnt1 dotaron a su vez resistencia a las células hospedadoras, validando de esta manera la incorporación de estos marcadores en sistemas de mutagénesis derivados de intrones del grupo II ya que pueden ser seleccionados de forma directa en placa de cultivo los eventos positivos de salto.

15 Podemos concluir que la incorporación de un marcador de resistencia tipo URE permite seleccionar de forma eficiente y directa los eventos de salto (mutagénesis dirigida) mediada por intrones del grupo II.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico **caracterizada por** tener al menos 60-200 nucleótidos y por comprender:
 - 5 a) al menos una secuencia codificante de al menos 18 nucleótidos que codifica un péptido con resistencia a drogas derivadas de macrólidos, dicho péptido presenta la siguiente fórmula:

$$a_1 - a_2 - a_3 - a_4 - a_5$$
 donde a_1 es Met, a_2 es cualquiera de los 20 aminoácidos naturales, a_3 es Leu o

10 Iso, a_4 es cualquiera de los 20 aminoácidos naturales y a_5 se selecciona entre Val, Thr ó Ile,
 - b) al menos un sitio de unión al ribosoma (RBS): secuencia rica en purinas que situada a una distancia entre 6-9 nucleótidos del codón de iniciación (ATG) del péptido citado en a), permite su traducción y
 - 15 c) al menos una secuencia promotora reconocida por una RNA polimerasa.

2. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 **caracterizada porque** la secuencia codificante de al menos 18 nucleótidos que codifica un

20 péptido con resistencia a drogas derivadas de macrólidos citada en a) codifica un péptido con la siguiente secuencia de aminoácidos:

$$\text{Met-Ser-Leu-Lys-Val.}$$

3. La molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 **caracterizada por** comprender:
 - 25 d) al menos una secuencia promotora inducible o constitutiva dependiente de la RNA polimerasa de la célula hospedadora, que comprende: pSyn, pTacl, pTaclII, pTrp, tic, trc, RecA, y pL.

4. La molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones

30 1 o 3 **caracterizada porque** la secuencia promotora citada en c) es reconocida por una RNA polimerasa de un fago que comprende a: T7, T3, y SP6.

5. La molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 **caracterizada porque** la secuencia codificante de al menos 18 nucleótidos

que codifica un péptido con resistencia a drogas derivadas de macrólidos citada en a) está total o parcialmente modificada mediante sustituciones nucleotídicas, deleciones o inserciones.

- 5 6. La molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5 **caracterizada porque** el sitio de unión al ribosoma (RBS) citado en b) y su distancia al codón de iniciación están total o parcialmente modificadas mediante sustituciones nucleotídicas, deleciones o inserciones.
- 10 7. La molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 6 **caracterizada porque** la secuencia promotora citada en c) es total o parcialmente modificada mediante sustituciones nucleotídicas, deleciones o inserciones.
- 15 8. La molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 7 **caracterizada porque** la secuencia codificante de al menos 18 nucleótidos que codifica un péptido con resistencia a drogas derivadas de macrólidos citada en a), el sitio de unión al ribosoma (RBS) citado en b) y la secuencia promotora citada en c) están total o parcialmente modificadas mediante sustituciones nucleotídicas,
20 deleciones o inserciones.
9. Uso de la molécula de ácido nucleico definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 8 en un proceso de mutagénesis que incluya tecnología derivada de transposones ó tecnología derivada de Intrones del grupo II.
- 25
10. Uso de la molécula de ácido nucleico definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 8 para la obtención de un Vector de Clonación.
11. Uso de la molécula de ácido nucleico definida en una cualquiera de las
30 reivindicaciones 1 o 8 en el etiquetado de un fragmento de ADN mediante la Amplificación en Cadena de la Polimerasa (PCR).

FIG. 1

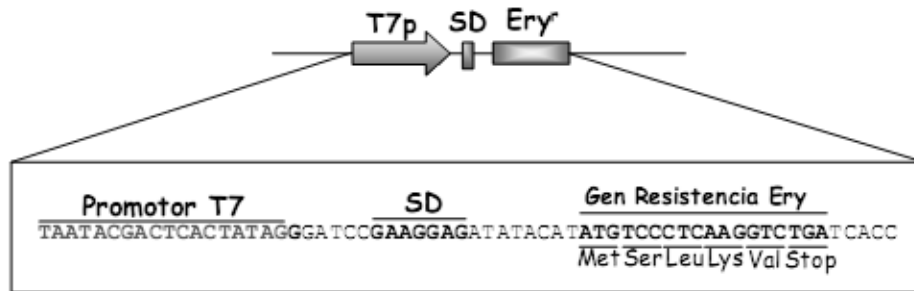


FIG. 2

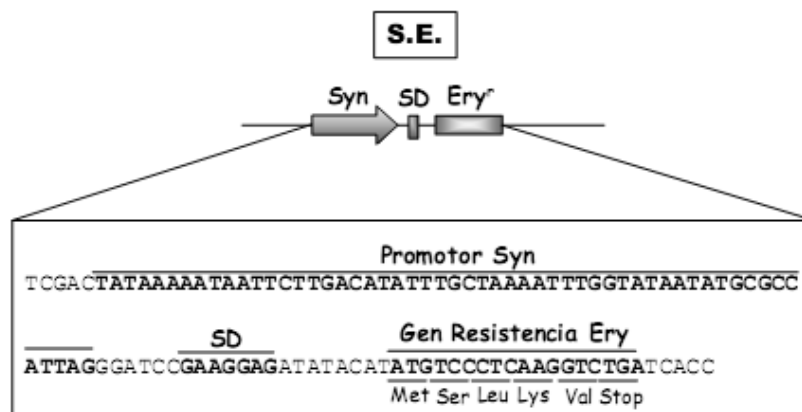


FIG. 3

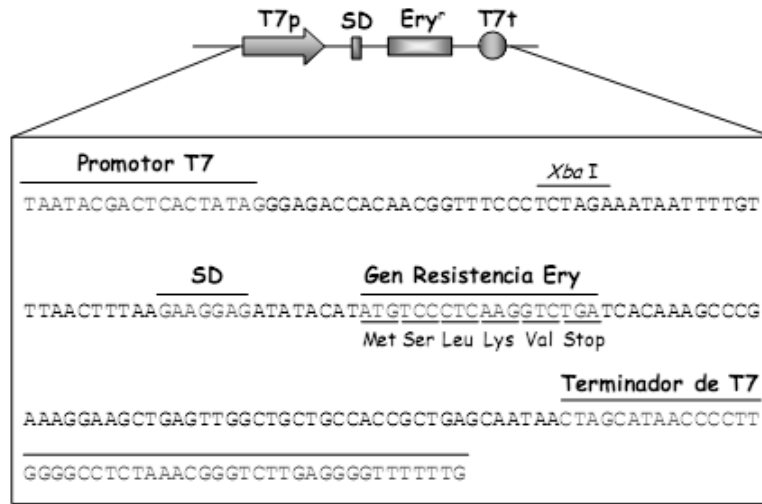
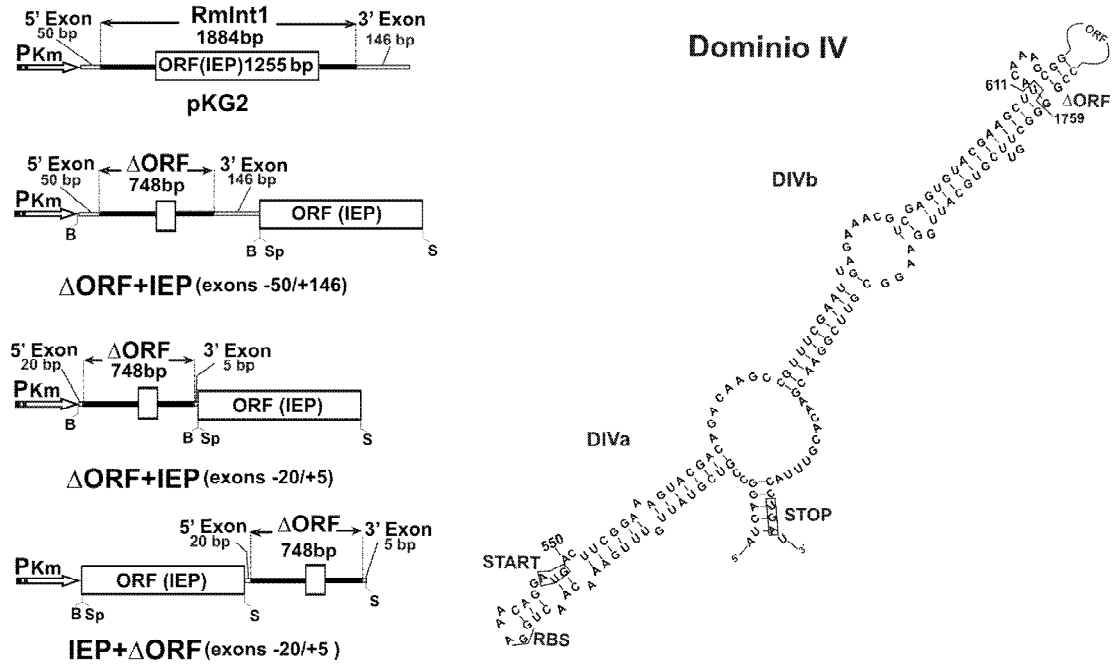


FIG. 4

A



B

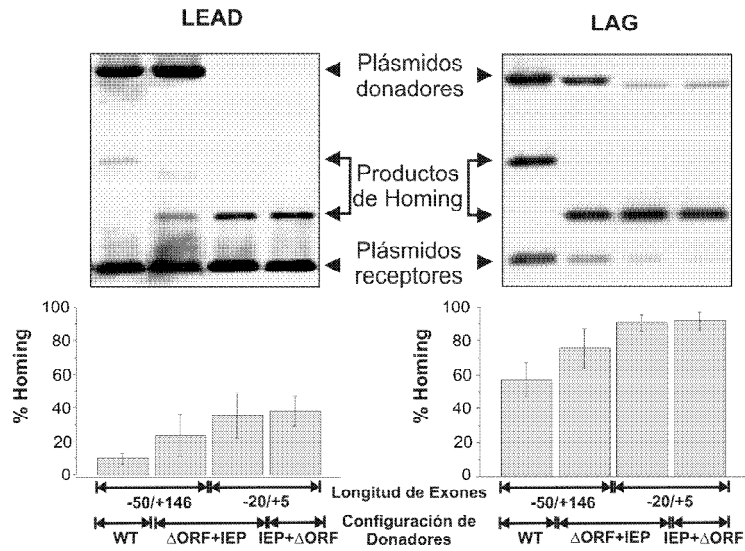
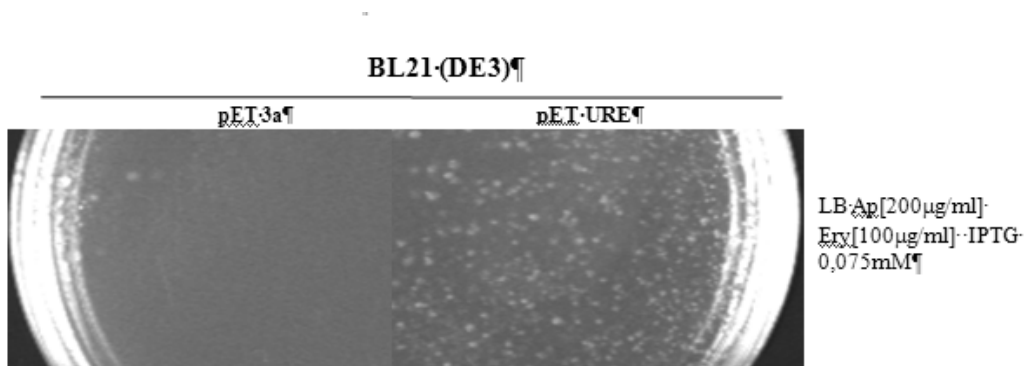


FIG. 5





(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPAÑOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
4) LUGAR DE PRESENTACION:		OEPM, Presentación Electrónica
(5) DIRECCION ELECTRONICA HABILITADA (DEH):		
(6-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACION SOCIAL: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/CIF/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CODIGO POSTAL: PAIS RESIDENCIA: CODIGO PAIS: TELEFONO: FAX: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCION DEL DERECHO:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC) España ES Q2818002D C/. Serrano, nº 117 MADRID 28 Madrid 28006 España ES <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(7-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/PASAPORTE:	TORO GARCIA NICOLAS España ES
(7-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/PASAPORTE:	MARTINEZ-ABARCA PASTOR FRANCISCO España ES
(7-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS:	NISA MARTINEZ RAFAEL España ES

DNI/PASAPORTE:		
(8) TÍTULO DE LA INVENCIÓN:		CONSTRUCCIÓN DE UNA UNIDAD DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE 60-200 NUCLEÓTIDOS EN TAMAÑO
(9) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI NO	[] [✓]
(10) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN	SI NO	[] [✓]
(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:	SI NO	[] [✓]
(12) DEPÓSITO:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	
(13) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS:	LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS	[✓] []
(14) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR: FECHA:	
(15) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:	
(16) AGENTE/REPRESENTANTE:	APELLIDOS: NOMBRE: CÓDIGO DE AGENTE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/CIF/PASAPORTE: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: NÚMERO DE PODER:	JAVIER UNGRIA LOPEZ 0392/1 España ES AVDA. RAMON Y CAJAL, 78 MADRID 28 Madrid 28043 España ES oepm@ungria.es 201101882
(17) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:	DESCRIPCIÓN: REIVINDICACIONES: DIBUJOS: RESUMEN: FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: ARCHIVO DE PRECONVERSION: DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN:	[✓] N.º de páginas: 18 [✓] N.º de reivindicaciones: 11 [✓] N.º de dibujos: 5 [✓] N.º de páginas: 1 [] N.º de figura(s): [✓] [] N.º de páginas:

<p style="text-align: center;">LISTA DE SECUENCIAS PDF: ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: OTROS (Aparecerán detallados):</p> <p style="text-align: center;">-OTRO1.pdf DECLARACIÓN SOBRE EL CONTENIDO</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 3</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1</p>
<p>(18) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:</p> <p style="text-align: center;">DOC COPIA DNI: DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: DOC COPIA OTROS:</p>	<p>[]</p> <p>[] N.º de páginas: [] N.º de páginas: [] N.º de páginas: [] N.º de páginas: [] N.º de páginas: [] N.º de páginas:</p>
<p>(19) NOTAS:</p>	
<p>(20) FIRMA:</p> <p style="text-align: center;">FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE: LUGAR DE FIRMA: FECHA DE FIRMA:</p>	<p>NOMBRE UNGRIA LOPEZ JAVIER - NIF 05211582N MADRID 16 Mayo 2011</p>