



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 353 302**

51 Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/66 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04001462 .3**
96 Fecha de presentación : **23.01.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1557464**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.07.2005**

54 Título: **Producción enzimática *de novo* de moléculas de ácido nucleico.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2011

73 Titular/es: **SLONING BIOTECHNOLOGY GmbH**
Zeppelinstr. 4
82178 Puchheim, DE

72 Inventor/es: **Schwer, Heinz;**
Horn, Gudrun y
Schatz, Octavian

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 353 302 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

La presente invención se refiere a procedimientos para la fabricación de una molécula de ácido nucleico.

5 La generación *de novo* de moléculas de ácido nucleico se usa de forma creciente en la investigación biofarmacéutica para reemplazar los procedimientos de clonación con frecuencia bastante complejos necesarios para producir construcciones de ADN deseadas con propiedades optimizadas, por ejemplo alto nivel de expresión de proteínas en sistemas *in vivo* o *in vitro* adecuados. Existe una diversidad de procedimientos conocidos para sintetizar tales moléculas de ADN. Prácticamente todos estos procedimientos se basan en la síntesis, 10 hibridación y ligación posterior de oligonucleótidos monocatenarios sintéticos para ensamblar moléculas de ADN bicatenario mayores que consisten típicamente en más de cien hasta varios miles de pares de bases. Sin embargo, la eficacia de estos procedimientos está limitada por varios factores: (i) la calidad de los oligonucleótidos usados, (ii) el tamaño de la construcción deseada y (iii) la proporción de secuencias “difíciles”, por ejemplo las que tienen regiones 15 autocomplementarias, alto contenido de GC, tétradas de G, acodamientos de ADN o bloques de secuencias repetitivas. Los componentes básicos de los oligonucleótidos están contaminados ellos mismos con diversos productos de terminación y deleciones internas. Son especialmente problemáticos los productos n-1 (oligonucleótidos que contienen deleciones internas de un nucleótido que se producen como resultado de reacciones de protección 20 incompletas), que difícilmente puede separarse del oligonucleótido deseado de cadena completa. Como tienen que ensamblarse muchos oligonucleótidos para generar un gen completo, la probabilidad de obtener un clon sin errores, es decir que no incorpore ni siquiera un oligonucleótido defectuoso con un cambio de base o una deleción interna se acerca al 0%. Por ejemplo, si un gen se ensambla a partir de 50 oligonucleótidos teniendo cada uno una 25 pureza del 90%, la probabilidad de crear un producto sin errores sería de aproximadamente $0,9^{50} = 0,005$. Generalmente, deben emplearse procedimientos tediosos de corrección de errores para obtener una construcción 100% sin errores. En muchos casos, los productos de síntesis defectuosa no pueden tolerarse debido a que errores en la secuencia codificante pueden provocar la generación de productos de transcripción o traducción acortados debido a 30 por ejemplo un cambio de fase de la fase abierta de lectura. Aunque los dos primeros problemas pueden mitigarse por el uso de oligonucleótidos de pureza muy alta, la formación de estructuras secundarias no deseadas que puedan provocar deleciones en el producto de síntesis puede en muchos casos suprimirse solamente si se permiten alteraciones en la secuencia de ADN.

35 En la técnica anterior se conocen una diversidad de procedimientos para producir ADN

sintético. Hace más de 20 años, el trabajo pionero de Khorana y colaboradores (Sekiya y col., 1979) demostró la síntesis completa *de novo* de un gen de ARNt supresor mediante la ligación de pares de oligonucleótidos hibridados. En este y otros procedimientos relacionados, los oligonucleótidos monocatenarios complementarios que comprenden la secuencia de ADN deseada completa se hibridan en pares para producir fragmentos bicatenarios, que se alinean en el orden correcto en virtud de salientes monocatenarios complementarios (Stabinsky, patente de Estados Unidos 4.652.639). Los fragmentos resultantes se ligan posteriormente secuencialmente o en una reacción en un tubo (Jayaraman, patente de Estados Unidos 5.132.215) enzimática o químicamente. Después de la purificación y/o clonación estos fragmentos génicos pueden unirse entre sí para formar construcciones de ADN más grandes. En la denominada "síntesis de casete", cada par de oligonucleótidos hibridados se clona de forma separada en un vector plasmídico antes de unir los fragmentos usando endonucleasas de restricción (Richards y col., patente de Estados Unidos 5.093.251).

Como alternativa, las construcciones de ADN pueden ensamblarse a partir de oligonucleótidos parcialmente hibridados, que contienen después de la hibridación huecos monocatenarios que deben llenarse mediante polimerasas de ADN; este procedimiento se denomina comúnmente procedimiento de "llenado de huecos". De acuerdo con este procedimiento se sintetizan una diversidad de oligonucleótidos parcialmente solapantes, se purifican y posteriormente se hibridan habitualmente en pares o en subgrupos. Después de la síntesis de las cadenas opuestas respectivas usando una ADN polimerasa los fragmentos individuales se ligan entre sí. Los productos de ligación bicatenarios generados de este modo pueden clonarse como fragmentos parciales o amplificarse en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores oligonucleotídicos terminales. Sin embargo, este procedimiento está asediado por frecuentes acontecimientos de cebado erróneo y deleciones internas debido a la formación de estructuras secundarias.

Ambos procedimientos son de uso limitado puesto que con una longitud creciente de la molécula de ácido nucleico a sintetizar la probabilidad de que se incorpore uno o varios oligonucleótidos con una secuencia incorrecta en el producto final aumenta. Dichos errores se copian después en la reacción de la ADN polimerasa. Además, también pueden producirse errores de secuencia durante la reacción de PCR.

Se describe una combinación de los procedimientos anteriores en la patente de Estados Unidos 6.472.184 en la que una serie de oligonucleótidos enlazables que representan regiones contiguas en una cadena de la secuencia diana se hibridan con oligonucleótidos no enlazables que son complementarios a los extremos 3' ó 5' de los oligonucleótidos enlazables que van a conectarse. Este procedimiento es relativamente simple y directo pero también se ve

asediado por los problemas comunes compartidos por todos los procedimientos que usan oligonucleótidos monocatenarios como componentes básicos: la formación de estructuras secundarias no deseadas y la incorporación de oligonucleótidos n-x, ambos de los cuales conducen a deleciones internas.

5 Además de estos procedimientos convencionales, existen procedimientos adicionales conocidos en la técnica para la producción de moléculas de ADN sintéticas. La solicitud de patente internacional WO 98/15567 y la patente de Estados Unidos 6.110.668 enseñan un procedimiento dirigido por molde para emparejar oligonucleótidos para producir construcciones de ADN sintético ligando una pluralidad de oligonucleótidos que son al menos parcialmente
10 complementarios al ADN molde monocatenario y se ligan los extremos de dichos oligonucleótidos en el orden correcto en etapas sucesivas de hibridación y desnaturalización. Sin embargo, una condición previa para la aplicación de este procedimiento es la existencia anterior de un ADN molde adecuado excluyendo su uso en síntesis *de novo*.

15 La solicitud de patente internacional WO 99/47536 desvela un procedimiento de síntesis génica de fase sólida en la que se ligan secuencialmente oligonucleótidos monocatenarios con una molécula iniciadora inmovilizada en una orientación definida. Una desventaja de este procedimiento es que se requieren muchas etapas para sintetizar genes grandes lo que da como resultado un rendimiento reducido y el enriquecimiento de secuencias defectuosas. Además, este procedimiento es difícil de automatizar lo que es un prerrequisito para una
20 síntesis rápida, normalizada.

25 La solicitud de patente internacional WO 00/75368 desvela una síntesis en fase sólida combinatoria de ácidos nucleicos usando una biblioteca de oligonucleótidos bicatenarios como componentes básicos normalizados. El uso de componentes básicos normalizados hace innecesario sintetizar un nuevo conjunto de oligonucleótidos para cada nueva síntesis. Estos oligonucleótidos bicatenarios de la biblioteca generalmente comparten una estructura global idéntica y por lo tanto evitan los problemas de síntesis habituales causados por la formación de estructuras secundarias alternativas de los componentes básicos de los oligonucleótidos tales como la introducción de deleciones. En una versión preferida, contienen un bucle terminal, un tallo bicatenario y un saliente corto monocatenario. Existen dos clases diferentes de
30 oligonucleótidos de la biblioteca, que se caracterizan por la presencia de diferentes sitios de reconocimiento para enzimas de restricción de tipo IIS dentro de su secuencia y la presencia o ausencia o el tipo de una modificación interna. Los nucleótidos en el saliente y la región directamente adyacente forman la porción variable que contribuye de hecho a que se sintetice el ácido nucleico; la secuencia restante generalmente es idéntica en todos los oligonucleótidos
35 que pertenecen a la misma clase.

Para construir un ácido nucleico bicatenario, su secuencia primero se divide en fragmentos más pequeños (habitualmente entre 6 y 30 pares de bases cada uno). Estos bloques denominados de elongación se sintetizan después en reacciones paralelas. En una reacción tal, se ligan dos oligonucleótidos bicatenarios de la biblioteca, uno de cada clase, mediante salientes monocatenarios coincidentes. Los productos de ligación de los mismos se escinden posteriormente con la enzima de restricción de tipo IIS, que es específica para el oligonucleótido que dona los nucleótidos. El efecto neto de un ciclo tal de ligación//restricción es la adición de un pequeño número de pares de bases (típicamente entre uno y cinco) al oligonucleótido de partida. Este procedimiento se repite después hasta que la síntesis del bloque de elongación deseado se complete.

En una segunda fase de reacción, la denominada transposición, los bloques de elongación que son adyacentes en el ácido nucleico a sintetizar se ligan en pares después de que se haya escindido cada bloque con una enzima de restricción de tipo IIS diferente. Repitiendo este procedimiento varias veces la longitud de los intermedios de transposición se dobla en cada etapa mientras que el número de reacciones se divide en dos. De este modo puede generarse una molécula de ácido nucleico definida en muy pocos ciclos. La ventaja de este procedimiento reside en el ensamblaje en pares combinatorio de los fragmentos de la molécula de ácido nucleico a sintetizar, de una manera independiente de secuencia. Puede generarse de este modo cualquier bloque de elongación deseado a partir de una biblioteca de ácidos nucleicos normalizada con un número definido de elementos.

El número de elementos de una biblioteca tal depende de la longitud de los salientes generados por la enzima de restricción de tipo IIS individual así como el número de nucleótidos que se añaden a los oligonucleótidos crecientes en cada ciclo de elongación.

Este procedimiento ofrece varias ventajas: puede automatizarse completamente puesto que no existe la necesidad de sintetizar y purificar nuevos oligonucleótidos para construir grandes genes o fragmentos de ADN, los componentes básicos se preparan a gran escala y pueden usarse para ensamblar muchas construcciones diferentes hasta que el abastecimiento se agote reduciendo de este modo el coste con respecto a nucleótidos en uno o dos órdenes de magnitud. Sin embargo, una desventaja inherente de este procedimiento es el hecho de que los intermedios individuales a ligar en pares pueden producirse con un rendimiento diferente. En algunos casos, la estequiometría desigual resultante de los compañeros de ligación puede conducir a la formación de productos secundarios no deseados que pueden disminuir adicionalmente el rendimiento de ligaciones posteriores.

La solicitud de patente internacional WO 03/0044193 (PCT/EP02/13154) se refiere a procedimientos para la producción de un ácido nucleico que se une a diversas secuencias

parciales de una manera independiente de secuencia.

El problema que subyace a la presente invención es proporcionar un procedimiento para la fabricación de una molécula de ácido nucleico que posibilite un rendimiento aumentado y/o una molécula de ácido nucleico que tenga una secuencia más precisa en comparación con los procedimientos de acuerdo con la técnica anterior.

Este y otros problemas se resuelven por la materia objeto de las reivindicaciones independientes. Pueden tomarse realizaciones preferidas a partir de las reivindicaciones dependientes.

En una realización del procedimiento de acuerdo con el primer aspecto el saliente monocatenario del oligonucleótido de protección, o parte del mismo, es esencialmente complementario a la secuencia parcial del oligonucleótido adicional o parte del mismo.

En una realización del procedimiento de acuerdo con el primer aspecto se prefiere la reacción de ligación entre el oligonucleótido adicional y el oligonucleótido de protección a la ligación del oligonucleótido adicional y el primer y segundo oligonucleótidos, respectivamente.

En una realización del procedimiento de acuerdo con el primer aspecto el oligonucleótido de protección no se liga al primer y segundo oligonucleótidos en la reacción de ligación.

En una realización del procedimiento de acuerdo con el primer aspecto el oligonucleótido de protección está contenido en la reacción de ligación en exceso, preferentemente de 2 a 10 veces.

En una realización del procedimiento de acuerdo con el primer aspecto el oligonucleótido de protección comprende una estructura en bucle, preferentemente una estructura en bucle en el extremo opuesto al del saliente monocatenario.

Más específicamente, de acuerdo con la presente invención el problema se resuelve en un primer aspecto mediante un procedimiento para la fabricación de una molécula de ácido nucleico, que comprende las etapas de

a) proporcionar un primer oligonucleótido al menos parcialmente bicatenario que comprende un sitio de reconocimiento para una primera enzima de restricción de tipo IIS que corta fuera de su sitio de reconocimiento y comprendiendo dicho oligonucleótido un saliente monocatenario;

b) proporcionar un segundo oligonucleótido al menos parcialmente bicatenario que comprende una modificación que permite al oligonucleótido acoplarse a una superficie, de modo que el oligonucleótido comprende adicionalmente un sitio de reconocimiento para una segunda enzima de restricción de tipo IIS que corta fuera de su sitio de reconocimiento y comprendiendo dicho segundo oligonucleótido un saliente

monocatenario;

c) ligar el primer y el segundo oligonucleótidos, mediante sus salientes generando un primer producto de ligación;

5 d) inmovilizar el primer producto de ligación en una superficie mediante la modificación proporcionada por el segundo oligonucleótido;

e) cortar el primer producto de ligación inmovilizado con la segunda enzima de restricción de tipo IIS liberando de este modo un primer oligonucleótido elongado que tiene un saliente y un segundo oligonucleótido acortado, que permanece unido a la superficie;

10 f) proporcionar un oligonucleótido adicional al menos parcialmente bicatenario que tiene una modificación que permite al oligonucleótido adicional acoplarse específicamente a una superficie, por lo cual el oligonucleótido contiene un sitio de reconocimiento para una segunda o una adicional enzima de restricción de tipo IIS y un saliente monocatenario que es complementario al saliente del primer oligonucleótido elongado;

15 g) ligar el oligonucleótido adicional al menos parcialmente bicatenario con el primer oligonucleótido elongado mediante sus salientes generando un producto de ligación de segundo nivel;

20 h) cortar el producto de ligación de segundo nivel con la segunda o adicional enzima de restricción de tipo IIS generando de este modo un oligonucleótido elongado de segundo nivel que tiene un saliente y un oligonucleótido adicional acortado;

i) inmovilizar el oligonucleótido adicional acortado;

25 j) repetir las etapas f) a i) al menos una vez, generando en la etapa g) un producto de ligación de nivel superior, por lo cual en la última repetición el oligonucleótido adicional entrante comprende un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción de tipo IIS que produce tras la escisión un saliente monocatenario idéntico en longitud al saliente generado por la primera enzima de restricción de tipo IIS específica para el primer oligonucleótido y las etapas h) e i) se reemplazan con las etapas k) y l);

k) inmovilizar el producto de ligación de nivel superior mediante la modificación proporcionada por el oligonucleótido adicional; y

30 l) cortar el producto de ligación de nivel superior con la enzima de restricción de tipo IIS adicional, dejando la parte del ácido nucleico a fabricar unida al primer oligonucleótido, que se libera preferentemente al sobrenadante y más preferentemente permitiendo su transferencia a un nuevo recipiente de reacción.

35 Más específicamente, de acuerdo con la presente invención el problema se resuelve en un segundo aspecto mediante un procedimiento para la fabricación de una molécula de ácido

nucleico, que comprende las etapas de

- 5 a) proporcionar un primer oligonucleótido al menos parcialmente bicatenario que comprende un sitio de reconocimiento para una primera enzima de restricción de tipo IIS que corta fuera de su sitio de reconocimiento y comprendiendo dicho oligonucleótido un saliente monocatenario;
- 10 b) proporcionar un segundo oligonucleótido al menos parcialmente bicatenario que comprende una modificación que permite al oligonucleótido acoplarse a una superficie, de modo que el oligonucleótido comprende adicionalmente un sitio de reconocimiento para una segunda enzima de restricción de tipo IIS que corta fuera de su sitio de reconocimiento y comprendiendo dicho segundo oligonucleótido un saliente monocatenario;
- c) ligar el primer y el segundo oligonucleótidos, mediante sus salientes generando un primer producto de ligación;
- 15 d) inmovilizar el primer producto de ligación en una superficie mediante la modificación proporcionada por el segundo oligonucleótido;
- e) cortar el primer producto de ligación inmovilizado con la segunda enzima de restricción de tipo IIS liberando de este modo un primer oligonucleótido elongado que tiene un saliente y un segundo oligonucleótido acortado, que permanece unido a la superficie;
- 20 f) proporcionar un oligonucleótido adicional al menos parcialmente bicatenario que tiene una modificación que permite al oligonucleótido adicional acoplarse específicamente a una superficie, por lo cual el oligonucleótido contiene un sitio de reconocimiento para una segunda o adicional enzima de restricción de tipo IIS y un saliente monocatenario que es complementario al saliente del primer oligonucleótido elongado;
- 25 g) ligar el oligonucleótido adicional al menos parcialmente bicatenario con el primer oligonucleótido elongado mediante sus salientes generando un producto de ligación de segundo nivel;
- h) cortar el producto de ligación de segundo nivel con la segunda o adicional enzima de restricción de tipo IIS generando de este modo un oligonucleótido elongado de segundo nivel que tiene un saliente y un oligonucleótido adicional acortado;
- 30 i) inmovilizar el oligonucleótido adicional acortado;
- j) repetir las etapas f) a i) al menos una vez, generando en la etapa g) un producto de ligación de nivel superior, por lo cual en la última repetición el oligonucleótido adicional entrante comprende un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción de tipo IIS que produce tras la escisión un saliente monocatenario idéntico en longitud al
- 35

saliente generado por la primer enzima de restricción de tipo IIS específica para el primer oligonucleótido y las etapas h) e i) se reemplazan con las etapas k) y l);

k) inmovilizar el producto de ligación de nivel superior mediante la modificación proporcionada por el oligonucleótido adicional; y

5 l) cortar el producto de ligación de nivel superior inmovilizado con la enzima de restricción de tipo IIS específica para el primer oligonucleótido, dejando la parte del ácido nucleico a fabricar unida al oligonucleótido adicional, que está inmovilizado en una superficie.

10 En una realización del procedimiento de acuerdo con el primer y/o segundo aspecto como etapa m) el producto de ligación de nivel superior inmovilizado cortado de la etapa l) del procedimiento de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención se liga con el producto de ligación de nivel superior cortado de la etapa l) del procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

15 En una realización del procedimiento de acuerdo con el primer y/o segundo aspecto el producto de ligación de nivel superior cortado de la etapa l) se escinde con la segunda enzima de restricción de tipo IIS antes de la etapa de ligación m).

En una realización del procedimiento de acuerdo con el primer y/o segundo aspecto el número de repeticiones en la etapa j) es dos, tres, cuatro, cinco o seis.

20 En una realización del procedimiento de acuerdo con el primer y/o segundo aspecto el saliente es un saliente 5' o 3'.

En una realización del procedimiento de acuerdo con el primer y/o segundo aspecto el saliente se selecciona del grupo que comprende un saliente de un nucleótido, un saliente de dos nucleótidos, un saliente de tres nucleótidos, un saliente de cuatro nucleótidos y un saliente de cinco nucleótidos.

25 En una realización del procedimiento de acuerdo con el primer y/o segundo aspecto el oligonucleótido al menos parcialmente bicatenario que comprende una región constante y una región variable, por lo cual la región constante contiene el sitio de reconocimiento para una enzima de restricción de tipo IIS y la región variable contiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde a una parte de la secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico a fabricar.

30 En una realización del procedimiento de acuerdo con el primer y/o segundo aspecto de la enzima de restricción tipo IIS adicional es la segunda enzima de restricción de tipo IIS.

En una realización del procedimiento de acuerdo con el primer y/o segundo aspecto el oligonucleótido elongado se transfiere a un recipiente de reacción diferente.

35 En una realización del procedimiento de acuerdo con el primer y/o segundo aspecto el

oligonucleótido elongado de segundo nivel se transfiere a un recipiente de reacción diferente.

En una realización del procedimiento de acuerdo con el primer y/o segundo aspecto los oligonucleótidos elongados de segundo nivel se usan como el oligonucleótido elongado en la etapa g).

5 En una realización del procedimiento de acuerdo con el primer y/o segundo aspecto la modificación del oligonucleótido elongado y/o del producto de ligación de nivel superior se proporciona por el oligonucleótido adicional al menos parcialmente bicatenario.

10 Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que el diseño de componente básicos que se usan en síntesis combinatoria de un ácido nucleico usando una biblioteca de oligonucleótidos bicatenarios como componentes básicos normalizados tal como se describe en la solicitud de patente internacional WO 00 /75368 o la solicitud de patente internacional PCT/EP03/11551, posibilita una optimización adicional de la síntesis de moléculas de ácido nucleico usando este tipo de estrategia de síntesis. Aunque las diversas realizaciones de dicha síntesis de fase sólida combinatoria han demostrado ser una herramienta valiosa para proporcionar moléculas de ácido nucleico, aún existe la necesidad de una síntesis aún más eficiente usando menos compuestos químicos, más particularmente menos cantidades de enzimas. Esta necesidad se satisface por los procedimientos y herramientas para llevar a cabo dichos procedimientos.

15 Las enzimas de restricción de tipo IIS como se usan en relación con cualquier aspecto de la presente invención son preferentemente cortadores externos, es decir enzimas de restricción que se caracterizan por el hecho de que interaccionan con dos sitios discretos de un ADN bicatenario. Uno de dichos dos sitios es el sitio de reconocimiento no palindrómico para dicha enzima de restricción que típicamente tiene una longitud de cuatro a siete pares de bases. El otro sitio es el sitio de escisión que típicamente está separado por de cero a veinte pares de bases del sitio de reconocimiento. Los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción son completamente o parcialmente asimétricos. Es una característica preferida de los cortadores externos que su sitio de escisión esté más allá, es decir fuera de su sitio de reconocimiento. Como se usa en el presente documento en realizaciones preferidas, los oligonucleótidos al menos parcialmente bicatenarios comprenden un sitio de reconocimiento para uno de al menos dos cortadores externos diferentes que pueden ser completa o parcialmente parte del oligonucleótido. Para posibilitar el funcionamiento apropiado del procedimiento de acuerdo con la presente invención, la enzima de restricción de tipo IIS cuyo sitio de reconocimiento está contenido en el primer y adicional oligonucleótido al menos parcialmente bicatenario, respectivamente, y que también se denomina en el presente documento la primera enzima de restricción de tipo IIS, respectivamente, y la enzima de

20

25

30

35

restricción de tipo IIS cuyo sitio de reconocimiento está contenido en el segundo oligonucleótido al menos parcialmente bicatenario y que también se denomina en el presente documento la segunda o adicional enzima de restricción tipo IIS, deben ser diferentes.

5 La siguiente tabla proporciona algunas posibles combinaciones de secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción tipo IIS.

Sitio de reconocimiento para el primer oligonucleótido	Sitio de reconocimiento para el segundo oligonucleótido
CGTCTCN [^] NNNN_ (Esp3I, BsmBI) (SEC ID N°: 1)	GGTCTCN [^] NNNN_ (Bsal, Eco31I...)
GGTCTCN [^] NNNN_ (Bsal, Eco31I,..) (SEC ID N°: 2)	CGTCTCN [^] TTNNN_ (Esp3I, BsmBI)
GAAGACNN [^] NNNN_ (BbsI, BpiI...) (SEC ID N°: 3)	ACCTGCNNNN [^] NNNN_ (BspMI, Acc36I)
ACCTGCNNNN [^] NNNN_ (BspMI, Acc36I) (SEC ID N°: 4)	GAAGACNN [^] NNNN_ (BbsI, BpiI...)
GCAGTG_NN [^] (BtsI) (SEC ID N°: 5)	GCAATG_NN [^] (BsrDI, Bse3DI, ..)
GCAATG_NN [^] (BsrDI, Bse3DI, ..) (SEC ID N°: 6)	GCAGTG_NN [^] (BtsI)
GTATCCNNNNN_N [^] (BciVI, BfuI) (SEC ID N°: 7)	ACTGGGNNNNN_N [^] (BfiI, Bmrl)
ACTGGGNNNNN_N [^] (BfiI, Bmrl) (SEC ID N°: 8)	GTATCCNNNNN_N [^] (BciVI, BfuI)
GGCGGANNNNNNNNNN_NN [^] (EciI) (SEC ID N°: 9)	GAGGAGNNNNNNNNN_NN [^] (BseRI)
GAGGAGNNNNNNNNN_NN [^] (BseRI) (SEC ID N°: 10)	GGCGGANNNNNNNNNN_NN [^] (EciI)
CACCTGCNNNN [^] NNNN_ (AarI) (SEC ID N°: 11)	CAGCTCNNNNNNN [^] NNN_ (AceIII)
CAGCTCNNNNNNN [^] NNN_ (AceIII) (SEC ID N°: 12)	CACCTGCNNNN [^] NNNN_ (AarI)
GCTCTTCN [^] NNN_ (SapI) (SEC ID N°: 13)	- (engarce adaptador necesario)
CTCTTCN [^] NNN_ (Eam1104I, Ksp6321, EarI) (SEC ID N°: 14)	- (engarce adaptador necesario)

por lo cual N = cualquiera de los nucleótidos A, G, C o T;

[^] es el sitio de escisión en la cadena superior, es decir 5' → 3' de izquierda a derecha y

- el sitio de escisión en la cadena inferior, es decir 5' – 3' de derecha a izquierda.

10 Son combinaciones preferidas de la primera y segunda (y adicionales) enzima de restricción de tipo IIS a usar en relación con la presente invención Eco31I/Esp3I (37°C), Bsal/BsmBI (50°C), BsmBI/Bsal (55°C), BbsI/BspMI (37°C), BspMI/BbsI (37°C) BsrDI/BtsI (65°C), BtsI/BsrDI (37°C), BciVI/Bmrl (37°C), AarI/AceIII (37°C), EciI/BseRI (37°C) y Bmrl/BciVI

(37°C). Las temperaturas entre paréntesis indican las temperaturas de incubación usadas para cada uno de los pares. Los isoesquizómeros de estas enzimas (Bsal: Bso31, Eco31I; BsmBI: Esp3I; BbsI: Bpil, BpuAI; BspMI: Acc36I; BsrDI: Bse3DI, BseMI; Bmrl: Bfil) son alternativas potenciales.

5 Está comprendida en una realización preferida de cualquier aspecto de la presente invención que cualquiera de los oligonucleótidos segundo y adicional que tienen una estructura al menos parcialmente bicatenaria, un saliente monocatenario y un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción de tipo IIS generalmente comprende al menos un nucleótido que puede escindirse del oligonucleótido tras digestión con dicha enzima de restricción. Más
10 preferentemente, dicho nucleótido o nucleótidos son parte de un ácido nucleico a fabricar.

 Como se usa en el presente documento, la expresión “que la modificación posibilita una unión específica” preferentemente significa que la unión se produce sólo en ciertas circunstancias o condiciones de reacción pero evita una unión no pretendida de la molécula que comprende dicha modificación. Debido a esto, dependiendo de las condiciones de
15 reacción o circunstancias existentes o realizadas, la molécula que comprende una modificación puede unirse a un compañero de interacción o no. Preferentemente dicho compañero de unión se une a una superficie, más preferentemente una fase sólida. Cualquier modificación que posibilite estas características puede usarse como una modificación que posibilita una unión específica. Este tipo de modificación puede ser una modificación como se describe en el
20 presente documento o en cualquiera de las solicitudes de patente internacional PCT/ DE 00/01863, PCT/EP 02/13154 o la solicitud de patente internacional PCT/EP 03/11551.

 De acuerdo con el primer y/o segundo aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de una molécula de ácido nucleico. Se reconocerá que este procedimiento es una variante del procedimiento RSPS tal como se describe en la solicitud de
25 patente internacional PCT/EP 03/11551 y el procedimiento RLPS que también se describe en dicha solicitud de patente internacional. Mediante la combinación de ambos procedimientos el procedimiento de acuerdo con al primer aspecto de la presente invención, la eficacia global del procedimiento se aumenta considerablemente. Este procedimiento también se denomina en el presente documento procedimiento S4LS. Brevemente, S4LS comprende un ciclo de reacción
30 de fase sólida, seguido de cuatro ciclos de reacción de fase líquida, que se siguen de nuevo de un ciclo de reacción de fase sólida final. La expresión “ciclo de reacción de fase sólida” implica que un producto de ligación en una etapa de elongación se une primero a una superficie después de lo cual el primer oligonucleótido elongado se escinde de esta superficie, produciendo un producto prácticamente puro. La expresión “ciclo de reacción de fase líquida”
35 significa que en una etapa de elongación el producto de ligación se escinde primero por la

segunda enzima de restricción de tipo IIS en la fase líquida después de lo cual los productos de reacción que contienen una modificación se unen a una superficie adecuada y de este modo se eliminan antes de entrar en un nuevo ciclo.

5 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, el rendimiento aumentado observado con relación al procedimiento S4LS, principalmente surge del hecho de que la cinética de las reacciones enzimáticas, particularmente las reacciones de escisión son mucho más rápidas en solución que en una fase sólida en la que las vías de difusión son muchos más largas. Los tiempos de incubación pueden por lo tanto acortarse, incrementando de este modo el rendimiento del procedimiento de *Sloning*. A diferencia del ciclo de reacción de fase sólida, sin embargo, no es posible una selección que evite que los primeros oligonucleótidos no ligados se transfieran a un nuevo ciclo de reacción.

10 La presente invención se ilustra ahora adicionalmente por las siguientes figuras y ejemplos que se proporcionan con el propósito de ejemplificar pero no con el propósito de limitar. A partir de dichas figuras y ejemplos pueden tomarse características, realizaciones y ventajas adicionales de los diversos aspectos de la presente invención solos o en combinación independientemente de si dicha característica única o combinación de características se desvela literalmente.

15 Las Figuras 1 y 2 muestran una ilustración esquemática del procedimiento S4LS;
La Figura 3 muestra un gel que representa la generación de tres bloques de elongación diferentes usando el procedimiento S4LS o el procedimiento de síntesis de fase sólida inversa; y
20 La Figura 4 muestra un diagrama que indica el rendimiento relativo de los diferentes bloques de elongación usando el procedimiento S4LS o el procedimiento de síntesis de fase sólida inversa (Figura 4A) y el rendimiento de diversos bloques de elongación en el procedimiento S4LS (Figura 4B), ambos basados en un análisis densitométrico del gel representado en la Figura 3.

25 Las Figuras 1 y 2 perfilan los ciclos de elongación del procedimiento S4LS, en el que el primer ciclo de reacción se lleva a cabo como un ciclo de fase sólida, es decir el producto de ligación del primer y segundo oligonucleótidos se une primero a la fase sólida como en la etapa d) y después se digiere con la enzima de restricción de tipo IIS cuyo sitio de reconocimiento está contenido en el segundo nucleótido como en la etapa e), liberando de este modo un primer oligonucleótido elongado. En las etapas posteriores f) a i) los ciclos de elongación se repiten pero el orden de la etapa de unión y escisión se invierte. Dicho procedimiento
35 aprovecha la mayor eficacia de escisión de las enzimas de restricción en solución a costa de

acumular primer oligonucleótido no reaccionado o primeros oligonucleótidos elongados. Sin embargo, puesto que en la repetición final, en las etapas k) y l) el orden de la etapa de unión y escisión se invierte de nuevo, se obtiene un producto de elongación purificado debido a que ninguno de los primeros oligonucleótidos no reaccionados o los primeros no elongados se unirán a la fase sólida ya que estas moléculas carecen de la modificación proporcionada por el segundo o adicional nucleótido.

Las Figuras 3 y 4 muestran una comparación entre tres bloques de elongación diferentes generados con el procedimiento S4LS como se describe en el presente documento y en los mismos bloques de elongación generados por el procedimiento RSPS (síntesis de fase sólida inversa). La principal diferencia entre los dos procedimientos es la inversión del orden de las etapas de unión y escisión como se ha descrito anteriormente. Como se predice teóricamente, el rendimiento global aumenta significativamente a costa de la acumulación de productos secundarios. En la quinta etapa, sin embargo, el último producto de ligación se une a la fase sólida antes de que tenga lugar la restricción dando como resultado en ambos casos un producto de elongación puro. Las bandas de los geles teñidos en la Figura 3 se cuantificaron usando una exploración densitométrica y sus intensidades relativas se representan en la Figura 4.

Ejemplo 1: Transposición semi invertida con Eco31I y Esp3I (no incluido en las reivindicaciones)

Se generaron bloques de elongación (E1-E4) usando procedimientos convencionales, es decir ligando los componentes respectivos tales como anclajes y esplínquer, en 150 μ l a 25°C durante 15 minutos (tampón Y⁺ 1 x, DTT 10 mM, ATP 0,5 mM), escindiendo los productos de ligación con las endonucleasas de corte exterior respectivas en el mismo tampón complementado con BSA 100 μ g/ml durante 60 a 90 minutos a 37°C y usando 15-100 U de enzima y uniendo a superficies adecuadas en el mismo tampón durante 20 minutos a 25°C. Los bloques de elongación E1 y E4 se cortaron con Esp3I (mediante la adición de 1 μ l que equivale a 100 U). Todos los bloques se unieron después a las placas apropiadas. Después de la unión los bloques E2 y E3 se cortaron con Eco31I (1150 μ l, que contenía 1 μ l de Eco31I 100 U/ml, 15 μ l de tampón Y⁺ y 134 μ l de H₂O). Los sobrenadantes de los bloques E2 y E3 se pipetearon en los pocillos que contenían los bloques E1 y E4, respectivamente, y se añadieron 1 μ l de ADN ligasa T4 (30 U/ μ l), 15 μ l de ATP 5 mM, 15 μ l de DTT 10 mM. Se permitió que la ligación continuara durante 1 hora a 25°C. Esto proporciona los productos de T1, T1.1 y T1.2.

Después los bloques ligados T1.1 y T1.2 se cortaron con Esp3I (en 150 μ l de volumen de reacción que contenía 1 μ l de Esp3I 100 U/ μ l, 15 μ l de tampón Y⁺, 15 μ l de DTT 100 mM y 129 μ l de H₂O). Después de lavar el bloque T1.2, este se cortó adicionalmente con Eco31I (150

(150 μl que contenían 1 μl de Eco31I 100 unidades/ μl , 15 μl de tampón Y^+ y 134 μl de H_2O). El sobrenadante del bloque T1.2 se pipeteó en el pocillo que contenía el bloque T1.1 y se añadieron 1 μl de ADN ligasa T4 (30 U/ μl), 15 μl de ATP 5 mM, 15 μl de DTT 100 mM. Se permitió que la ligación continuara durante 1 hora a 25°C para producir el producto de T2; T2.1.

5 En consecuencia, se genera otro producto de transposición de segundo orden por el mismo ciclo de reacciones para de un quinto a un octavo bloque de elongación. Esta molécula se denomina T2.2 y se escinde con Eco31I. El T2.2 cortado se libera de la fase sólida y se transfiere a la reacción de T2.1, preferentemente el recipiente de reacción que contiene el intermedio T2.1. Tras la ligación, se forma un tercer producto de transposición de orden, que
10 se llama T3.1.

Ejemplo 2: Transposición semi invertida alternativa con Eco31I y Esp3I (no incluido en las reivindicaciones)

Usando el procedimiento de *Sloning* como se describe en la solicitud de patente PCT/EP 03/11551, se ensamblaron primero los anclajes y esplínquer en varios sitios de
15 ligación/restricción/unión (ligación: 150 μl a 25°C durante 15 a 30 minutos (tampón Y^+ 1 x, DTT 10 mM, ATP 0,5 mM), restricción en el mismo tampón complementado con BSA 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ con de 15 a 100 unidades de Earn11041 de 60 a 90 minutos a 37°C, unión en el mismo tampón durante 15 minutos a 25°C) para producir los bloques de elongación (E1-4). Los bloques de elongación 1 y 4 se cortaron con Esp3I en Y^+ 1 x (mediante la adición de 200 U de enzima).
20 Todos los bloques se unieron después a las placas apropiadas. Después de la unión, los bloques E2 y E3 se cortaron con Eco31I (en 150 μl de volumen de reacción que contenía 1 μl de Eco 31I 100 U/ μl , 15 μl de tampón Y^+ 10 x y 134 μl de H_2O). Los sobrenadantes de los bloques E2 y E3 se pipetearon en los pocillos que contenían los bloques E1 y E4, respectivamente, y se añadieron 1 μl de ADN ligasa T4 (30 U/ μl), 15 μl de ATP 5 mM, 15 μl de
25 DTT 10 mM y 2 μl de Esp3I. Se permitió que la ligación y la digestión con Esp3I continuaran simultáneamente durante 1 hora a 37°C. Esto es para asegurar que los trozos bicatenarios cortos (15 nucleótidos en cada cadena, pero con sólo 11 pares de bases solapantes) no se desnaturalizan mediante una etapa de activación de 10 minutos a 65°C. El resto del procedimiento es como el de la transposición semi invertida.

30 Citas bibliográficas

Las siguientes referencias son las que se mencionan en la presente solicitud. Las referencias se proporcionan aquí para evitar cualquier repetición innecesaria a lo largo del texto de la solicitud.

35 Sekiya T, Brown EL, Belagaje R, Fritz HJ, Gait MJ, Lees RG, Ryan MJ, Khorana HG, Norris KE. (1979) Total synthesis of a tyrosine suppressor tRNA gene. XV. Synthesis of the

- promoter region. *J Biol Chem.* 254(13): 5781-6.
- Sekiya T, Takeya T, Brown EL, Belagaje R, Contreras R, Fritz HJ, Gait MJ, Lees RG, Ryan MJ, Khorana HG, Norris KE. (1979) Total synthesis of a tyrosine suppressor transfer RNA gene. XVI. Enzymatic joinings to form the total 207-base pair-long DNA. *J Biol Chem.* 254(13): 5787-801.
- 5 Stabinsky, Yitzhak (1987)
 Manufacture and expression of structural genes
 Patente de Estados Unidos 4.652.639
- Jayaraman, Krishna, Burdick, Brent A, Oakes, Fred T. (1992)
- 10 Method of making double-stranded DNA sequences
 Patente de Estados Unidos 5.132.215
- Richards, John H, Iverson; Sheila A., Perez, Dianne M. (1992)
 Cassette method of gene synthesis
 Patente de Estados Unidos 5.093.251
- 15 Hegemann P (2002)
 Method for producing nucleic acid polymers
 Patente de Estados Unidos 6.472.184 Strizhov, Nicolai, Koncz, Csaba, Schell, Jeff (2000)
 Gene synthesis method
 Patente de Estados Unidos 6.110.668
- 20 Hoare D G, .Koshland D E, Jr. (1967) A Method for the Quantitative Modification and Estimation of Carboxylic Acid Groups in Proteins *J. Biol. Chem.* 242: 2447 - 2453.
- Johnsson B, Lofas S, Lindquist G. (1991) Immobilisation of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem.* 198: 268-77.
- 25 Bolli M, Micura R, Eschenmoser A. (1997) Pyranosyl-RNA: chiroselective self-assembly of base sequences by ligative oligomerization of tetranucleotide-2',3'-cyclophosphates (with a commentary concerning the origin of bio-molecular homochirality). *Chem Biol.* (4): 309-20.
- Serke S, Pachmann K (1988) An immunocytochemical method for the detection of fluorochrome-labelled DNA probes hybridized in situ with cellular RNA. *J Immunol Methods.* 112(2): 207-11.
- 30 Kessler C, Holtke HJ, Seibl R, Burg J, Muhlegger K. (1990) Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids.
 I. A novel DNA labeling and detection system based on digoxigenin: anti-digoxigenin ELISA principle (digoxigenin system). *Biol Chem Hoppe Seyler.* 371(10):917-27.
- 35 Wu DY, Wallace RB. (1989) Specificity of the nick-closing activity of bacteriophage T4 DNA

DNA ligase. Gene. 76(2): 245-54.

Las características de la presente invención desveladas en la memoria descriptiva, las reivindicaciones y/o los dibujos pueden ser todos de forma separada y en cualquier combinación de los mismos materiales para realizar la invención en diversas formas de la misma.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la fabricación de una molécula de ácido nucleico, que comprende las etapas de

- 5 a) proporcionar un primer oligonucleótido al menos parcialmente bicatenario que comprende un sitio de reconocimiento para una primera enzima de restricción de tipo IIS que corta fuera de su sitio de reconocimiento y comprendiendo dicho oligonucleótido un saliente monocatenario;
- 10 b) proporcionar un segundo oligonucleótido al menos parcialmente bicatenario que comprende una modificación que permite al oligonucleótido acoplarse a una superficie, por lo cual el oligonucleótido comprende adicionalmente un sitio de reconocimiento para una segunda enzima de restricción de tipo IIS que corta fuera de su sitio de reconocimiento y comprendiendo dicho segundo oligonucleótido un saliente monocatenario;
- 15 c) ligar el primer y el segundo oligonucleótidos mediante sus salientes generando un primer producto de ligación;
- d) inmovilizar el primer producto de ligación en una superficie mediante la modificación proporcionada por el segundo oligonucleótido;
- 20 e) cortar el primer producto de ligación inmovilizado con la segunda enzima de restricción de tipo IIS liberando de este modo un primer oligonucleótido elongado que tiene un saliente y un segundo oligonucleótido acortado, que permanece unido a la superficie;
- 25 f) proporcionar un oligonucleótido adicional al menos parcialmente bicatenario que tiene una modificación que permite al oligonucleótido adicional acoplarse de forma específica a una superficie, por lo cual el oligonucleótido contiene un sitio de reconocimiento para una segunda o una adicional enzima de restricción de tipo IIS y un saliente monocatenario que es complementario al saliente del primer oligonucleótido elongado;
- 30 g) ligar el oligonucleótido adicional al menos parcialmente bicatenario con el primer oligonucleótido elongado mediante sus salientes generando un producto de ligación de segundo nivel;
- h) cortar el producto de ligación de segundo nivel con la segunda o adicional enzima de restricción de tipo IIS generando de este modo un oligonucleótido elongado de segundo nivel que tiene un saliente y un oligonucleótido adicional acortado;
- i) inmovilizar el oligonucleótido adicional acortado;
- 35 j) repetir las etapas f) a i) al menos una vez, generando en la etapa g) un producto de

ligación de nivel superior, por lo cual en la última repetición el oligonucleótido adicional entrante comprende un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción de tipo IIS que produce tras la escisión un saliente monocatenario idéntico en longitud al saliente generado por la primer enzima de restricción de tipo IIS específica para el primer oligonucleótido y las etapas h) e i) se reemplazan con las etapas k) y l);

k) inmovilizar el producto de ligación de nivel superior mediante la modificación proporcionada por el oligonucleótido adicional; y

l) cortar el producto de ligación de nivel superior con la enzima de restricción de tipo IIS adicional, dejando la parte del ácido nucleico a fabricar unida al primer oligonucleótido, que se libera preferentemente al sobrenadante y más preferentemente permitiendo su transferencia a un nuevo recipiente de reacción.

2. Procedimiento para la fabricación de una molécula de ácido nucleico, que comprende las etapas de

a) proporcionar un primer oligonucleótido al menos parcialmente bicatenario que comprende un sitio de reconocimiento para una primera enzima de restricción de tipo IIS que corta fuera de su sitio de reconocimiento y comprendiendo dicho oligonucleótido un saliente monocatenario;

b) proporcionar un segundo oligonucleótido al menos parcialmente bicatenario que comprende una modificación que permite al oligonucleótido acoplarse a una superficie, por lo cual el oligonucleótido comprende adicionalmente un sitio de reconocimiento para una segunda enzima de restricción de tipo IIS que corta fuera de su sitio de reconocimiento y comprendiendo dicho segundo oligonucleótido un saliente monocatenario;

c) ligar el primer y el segundo oligonucleótidos mediante sus salientes generando un primer producto de ligación;

d) inmovilizar el primer producto de ligación en una superficie mediante la modificación proporcionada por el segundo oligonucleótido;

e) cortar el primer producto de ligación inmovilizado con la segunda enzima de restricción de tipo IIS liberando de este modo un primer oligonucleótido elongado que tiene un saliente y un segundo oligonucleótido acortado, que permanece unido a la superficie;

f) proporcionar un oligonucleótido adicional al menos parcialmente bicatenario que tiene una modificación que permite al oligonucleótido adicional acoplarse específicamente a una superficie, por lo cual el oligonucleótido contiene un sitio de reconocimiento para

una segunda o adicional enzima de restricción de tipo IIS y un saliente monocatenario que es complementario al saliente del primer oligonucleótido elongado;

g) ligar el oligonucleótido adicional al menos parcialmente bicatenario con el primer oligonucleótido elongado mediante sus salientes generando un producto de ligación de segundo nivel;

h) cortar el producto de ligación de segundo nivel con la segunda o adicional enzima de restricción de tipo IIS generando de este modo un oligonucleótido elongado de segundo nivel que tiene un saliente y un oligonucleótido adicional acortado;

i) inmovilizar el oligonucleótido adicional acortado;

j) repetir las etapas f) a i) al menos una vez, generando en la etapa g) un producto de ligación de mayor nivel, por lo cual en la última repetición el oligonucleótido adicional entrante comprende un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción de tipo IIS que produce tras la escisión un saliente monocatenario idéntico en longitud al saliente generado por la primer enzima de restricción de tipo IIS específica para el primer oligonucleótido y las etapas h) e i) se reemplazan con las etapas k) y l);

k) inmovilizar el producto de ligación de nivel superior mediante la modificación proporcionada por el oligonucleótido adicional; y

l) cortar el producto de ligación de nivel superior inmovilizado con la enzima de restricción de tipo IIS específica para el primer oligonucleótido, dejando la parte del ácido nucleico a fabricar unida al oligonucleótido adicional, que se inmoviliza en una superficie.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 y/o 2, en el que como etapa m) el producto de ligación de nivel superior inmovilizado cortado de la etapa l) de la reivindicación 2 se liga con el producto de ligación de nivel superior cortado de la etapa l) de la reivindicación 1.

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el producto de ligación de nivel superior cortado de la etapa l) de la reivindicación 3 se escinde con la segunda enzima de restricción de tipo IIS antes de la etapa de ligación m).

5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el número de repeticiones en la etapa j) es dos, tres, cuatro, cinco o seis.

6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el saliente es un saliente 5' o 3'.

7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el saliente se selecciona del grupo que comprende un saliente de un nucleótido, un saliente de dos nucleótidos, un saliente de tres nucleótidos, un saliente de cuatro nucleótidos y un saliente de cinco nucleótidos.

5

8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el oligonucleótido al menos parcialmente bicatenario comprende una región constante y una región variable, por lo cual la región constante contiene el sitio de reconocimiento para una enzima de restricción de tipo IIS y la región variable contiene una secuencia de ácido nucleico que corresponde a una parte de la secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico a fabricar.

10

9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la enzima adicional de restricción de tipo IIS es la segunda enzima de restricción de tipo IIS.

15

10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el oligonucleótido elongado se transfiere a un recipiente de reacción diferente.

11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el oligonucleótido elongado de segundo nivel se transfiere a un recipiente de reacción diferente.

20

12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el oligonucleótido elongado de segundo nivel se usa como el oligonucleótido elongado en la etapa g).

25

13. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la modificación del oligonucleótido elongado y/o del producto de ligación de nivel superior está proporcionado por el oligonucleótido adicional al menos parcialmente bicatenario.

Fig.1 – S4LS

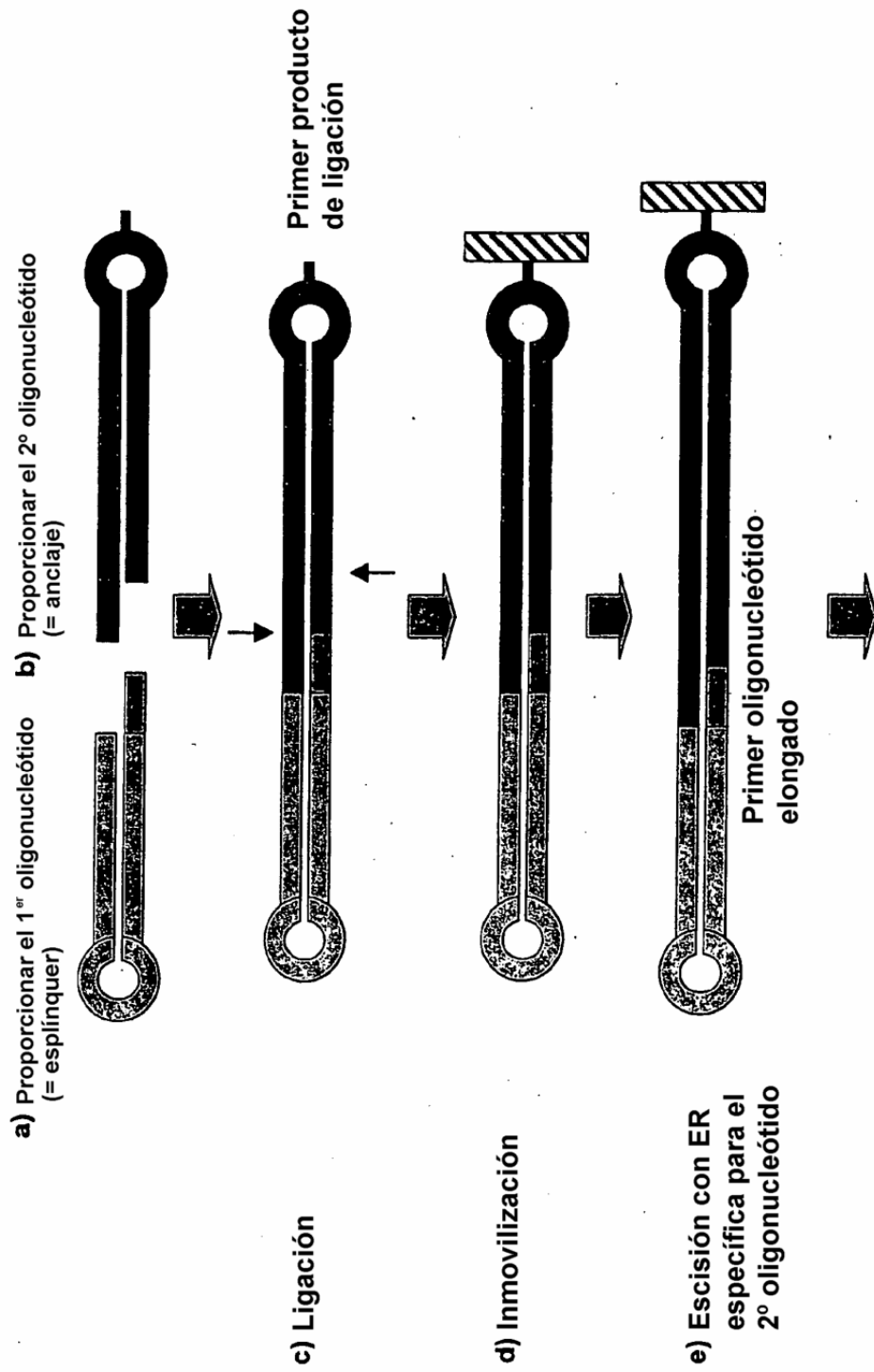


Fig. 2 – S4LS

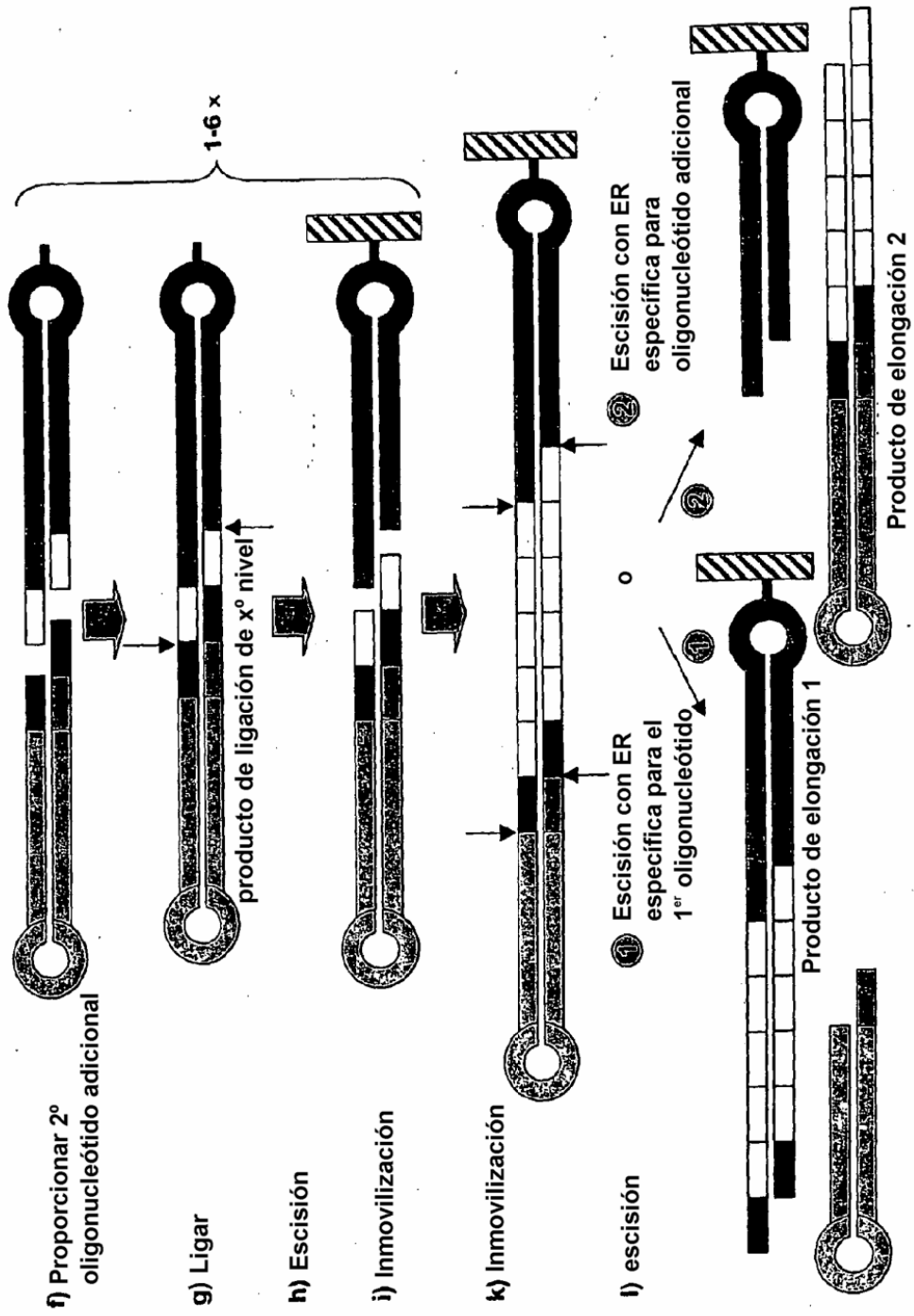


Fig.3 – S4LS contra RSPS

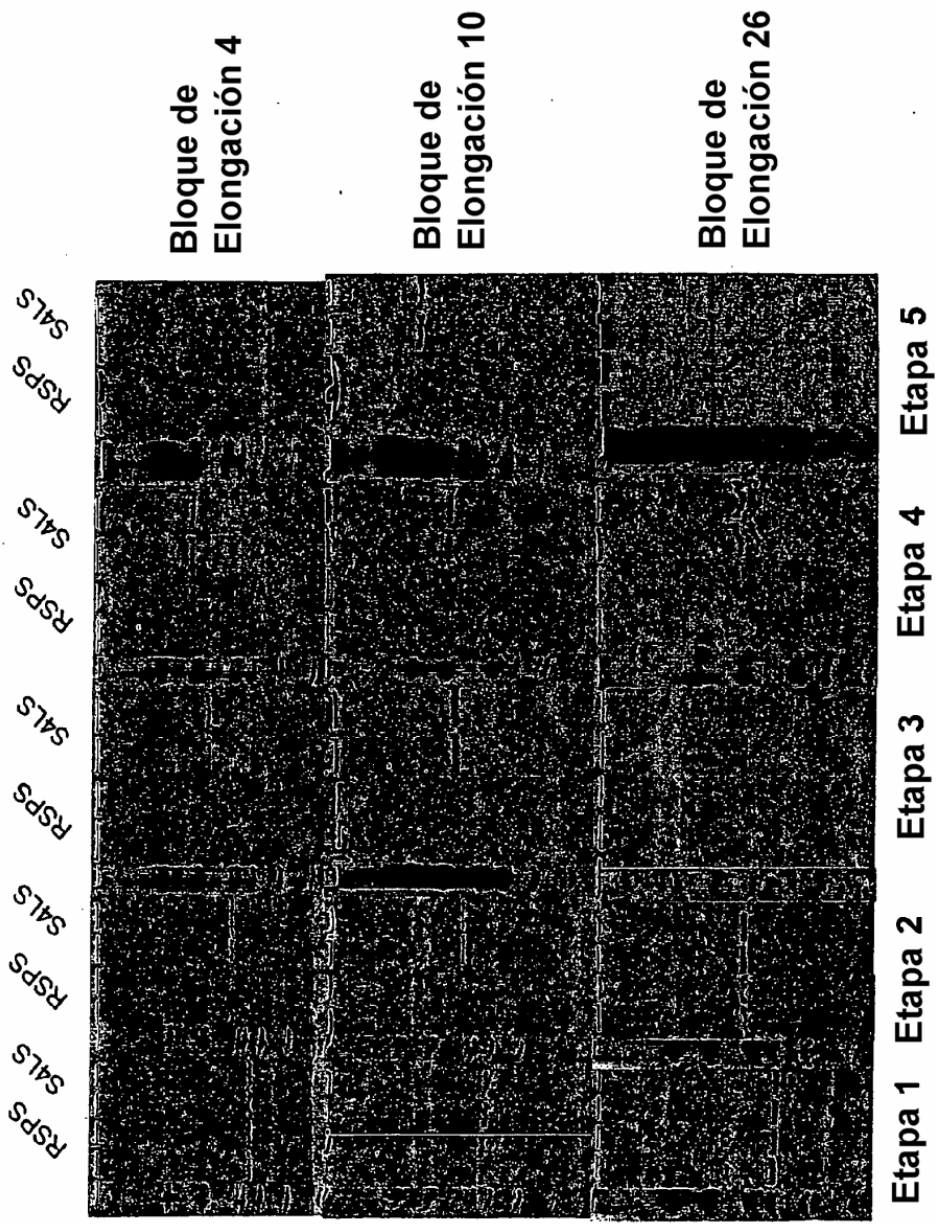


Fig. 4 – S LS contra RSPS

