

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 534**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/113** (2010.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A01K 67/027** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05013010 .3**  
96 Fecha de presentación: **19.03.1999**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1624060**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.02.2006**

54 Título: **CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE GENES.**

30 Prioridad:  
**20.03.1998 AU pp249298**  
**20.03.1998 AU pp249998**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.02.2012**

73 Titular/es:  
**COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL  
RESEARCH ORGANISATION  
LIMESTONE AVENUE  
CAMPBELL, ACT 2612, AU**

72 Inventor/es:  
**Graham, Michael Wayne;**  
**Rice, Robert Norman;**  
**WATERHOUSE, Peter Michael y**  
**WANG, MingBo**

74 Agente: **Pérez Barquín, Eliana**

**ES 2 374 534 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**

Control de la expresión de genes

**CAMPO DE LA INVENCION**

- 5 La presente invención se relaciona generalmente con un método para modificar la expresión de genes y con genes sintéticos para modificar la expresión endógena de genes en una célula, tejido u órgano eucariótico de un organismo transgénico, en particular de una planta o animal transgénico. Más particularmente, la presente invención utiliza tecnología de ADN recombinante para modificar o modular postranscripcionalmente la expresión de un gen objetivo en una célula, tejido, órgano u organismo completo eucariótico, por lo que se producen fenotipos novedosos. Los genes sintéticos novedosos y los constructos genéticos los cuales son capaces de reprimir, retardar o reducir de alguna otra manera la expresión de un gen endógeno o un gen objetivo en un organismo cuando se introduce en el mismo, también se proporciona.

**GENERALIDADES**

Los detalles bibliográficos de las publicaciones a las que se hace referencia en esta especificación se recolectan al final de la descripción

- 15 Como se utiliza en la presente, el término "derivado de" se debe tomar para indicar que se puede obtener un entero especificado a partir de una fuente o especie especificada particular, aunque no necesariamente de manera directa de la fuente o especie especificada.

- 20 A través de esta especificación, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, la palabra "comprende" o variaciones tales como "que comprende" o "comprendido" se entenderá que implica la inclusión de una etapa o elemento o entero o grupo de etapas o elementos o enteros establecidos, pero no la exclusión de ninguna etapa o elemento o entero o grupo de elementos o enteros.

- 25 Aquellos expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita aquí es susceptible a variaciones y modificaciones diferentes a las descritas específicamente. Se debe entender que la invención incluye la totalidad de variaciones y modificaciones. La invención también incluye la totalidad de las etapas, rasgos, composiciones y compuestos a los que se hace referencia o que se indican en esta especificación, individual o colectivamente, y cualquiera y la totalidad de las combinaciones o cualquiera de dos o más etapas o características.

La presente invención no se limita en alcance por las realizaciones específicas descritas aquí, las cuales se pretenden para propósitos de ejemplificación únicamente. Los productos, composiciones y métodos funcionalmente equivalentes están claramente dentro del alcance de la invención como se describe aquí.

- 30 Los números de identidad de secuencia (SEC. DE IDENT. NOS) que contienen información de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos incluidos en esta especificación se recolectan después del extracto y se han preparado utilizando el programa PatentIn Version 2.0. Cada nucleótido o secuencia de aminoácidos se identifica en la lista de secuencia por el indicador numérico <210> seguido por el identificador de secuencia (por ejemplo <210>1, <210>2, etc.). La longitud, tipo de secuencia (ADN, proteína (PRT), etc.), y el organismo de fuente para cada secuencia nucleotídica o de aminoácidos se indica por la información que se proporciona en los campos de indicador numérico <211>, <212> y <213>, respectivamente. Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos a los que se hace referencia en la especificación se definen por la información que se proporciona en el campo de indicador numérico <400> seguido por el identificador de secuencia (por ejemplo <400>1, <400>2, etc.

- 40 La designación de residuos nucleotídicos a los que se hace referencia en la presente son los recomendados por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission, en donde A representa adenina, C representa citosina, G representa guanina, T representa timina, Y representa un residuo pirimidina, R representa un residuo purina, M representa adenina o citosina, K representa guanina o timina, S representa guanina o citosina, W representa adenina o timina, H representa un nucleótido diferente de guanina, B representa un nucleótido diferente de adenina; V representa un nucleótido diferente de timina, D representa un nucleótido diferente de citosina y N representa cualquier residuo nucleotídico.

- 45 La designación de residuos aminoácidos a los que se hace referencia en la presente, recomendada por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission, se incluyen en la tabla 1.

TABLA 1

| Aminoácido           | Código de tres letras | Código de una letra |
|----------------------|-----------------------|---------------------|
| Alanina              | Ala                   | A                   |
| Arginina             | Arg                   | R                   |
| Asparagina           | Asn                   | N                   |
| Ácido aspártico      | Asp                   | D                   |
| Cisteína             | Cys                   | C                   |
| Glutamina            | Gln                   | Q                   |
| Ácido glutámico      | Glu                   | E                   |
| Glicina              | Gly                   | G                   |
| Histidina            | His                   | H                   |
| Isoleucina           | Ile                   | I                   |
| Leucina              | Leu                   | L                   |
| Lisina               | Lys                   | K                   |
| Metionina            | Met                   | M                   |
| Fenilalanina         | Phe                   | F                   |
| Prolina              | Pro                   | P                   |
| Serina               | Ser                   | S                   |
| Treonina             | Thr                   | T                   |
| Triptófano           | Trp                   | W                   |
| Tirosina             | Tyr                   | Y                   |
| Valina               | Val                   | V                   |
| Aspartato/asparagina | Baa                   | B                   |
| Glutamato/Glutamina  | Zaa                   | Z                   |
| Cualquier aminoácido | Xaa                   | X                   |

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

5 El control de las vías metabólicas en organismos eucarióticos es deseable con el propósito de producir rasgos novedosos en los mismos o de introducir rasgos novedosos en células, tejidos u órganos particulares de tal organismo. Aunque la tecnología de ADN recombinante ha proporcionado un progreso significativo en la comprensión de los mecanismos que regulan la expresión de genes eucarióticos, se ha hecho un progreso mucho menor en la manipulación real de la expresión de genes para producir rasgos novedosos. Además, existen únicamente medios limitados mediante los cuales la invención humana puede llevar a una modulación del nivel de la expresión del gen eucariótico.

10 Una solución para reprimir, retardar o reducir de alguna otra manera la expresión de genes utiliza una molécula de ARNm la cual se transcribe de la cadena complementaria de un gen nuclear a aquel el cual normalmente se transcribe capaz de ser traducido en un polipéptido. Aunque el mecanismo preciso involucrado en este enfoque no se ha establecido, se ha postulado que el ARNm de cadena doble puede formar el pareamiento de bases entre secuencias nucleotídicas complementarias, para producir un complejo el cual se traduce con baja eficiencia y/o se degrada por enzimas de ribonucleasa intracelulares antes de ser traducido.

15

Alternativamente, la expresión de un gen endógeno en una célula, tejido u órgano se puede suprimir cuando una o más copias de tal gen, o una o más copias de un gen sustancialmente similar se introducen en la célula. Aunque el mecanismo involucrado en este fenómeno no se ha establecido y parece involucrar procesos mecanísticamente heterogéneos. Por ejemplo, este enfoque se ha postulado que involucra represión transcripcional, en cuyo caso se forman estados reprimidos somática-heredablemente de cromatina, o bien alternativamente, un silenciador transcripcional en donde normalmente se produce el inicio de la transcripción, pero los productos de ARN en los genes cosuprimidos posteriormente se eliminan.

La eficiencia de ambos enfoques en el direccionamiento de la expresión de genes específicos es muy baja y habitualmente se obtienen resultados altamente variables. Los resultados inconsistentes se obtienen utilizando regiones diferentes de los genes, por ejemplo regiones 5' no traducidas, regiones 3' no traducidas, regiones codificantes o secuencias de intrón para la expresión del gen objetivo. En consecuencia, actualmente no existe consenso respecto a la naturaleza de las secuencias genéticas las cuales proporcionan el medio más eficiente para reprimir, retardar o reducir de alguna otra manera la expresión de genes utilizando las tecnologías existentes. Además, tal grado elevado de variación existe entre generaciones de manera que no es posible predecir el nivel de represión de un gen específico en la progenie de un organismo en el cual la expresión del gen es modificada marcadamente.

Recientemente, Dorer y Henikoff (1994) demostraron el silenciado de copias de genes repetidas en batería en el genoma de *Drosophila* y la represión transcripcional de genes Adh de *Drosophila* dispersado por genes *Polycomb* (es decir, el sistema Pc-G; Pal-Bhadra et al., 1997). Sin embargo, tal silenciado de copias de genes repetidas en batería es de poca utilidad en un intento por manipular la expresión de genes en una célula animal por medios recombinantes, en donde las secuencias capaces de dirigir la expresión de un gen particular se introducen en posiciones dispersadas en el genoma, ausentes de la combinación de este enfoque con la tecnología de direccionamiento de genes. Aunque teóricamente es posible, tales combinaciones se espera que trabajen únicamente a baja eficiencia, en base en la baja eficiencia de las soluciones de direccionamiento de genes utilizadas en el aislamiento y además, esto puede requerir complicados sistemas de vectores. Además, la utilización de represión transcripcional, tal como en el sistema Pc-G de *Drosophila*, puede parecer que requiera cierto conocimiento de los mecanismos reguladores capaz de modular la expresión de cualquier gen objetivo específico y, como una consecuencia, puede ser difícil de incrementar en la práctica como una tecnología general para reprimir, retardar o reducir la expresión de genes en células animales.

Sijen et al. (MPMI, 1995, 8(3):340-347) divulgan que la transformación de las plantas *Nicotiana benthamiana* con un gen del virus del mosaico del caupí (CPMV, por sus siglas en inglés) puede conferir resistencia a un cambio posterior con CPMV y sugieren que la resistencia está mediada por ARN. En una publicación posterior, Sijen et al. (The Plant Cell, 1996, 8:2277-2294) mostraron que la frecuencia de las líneas de resistencia aumentó cuando contenían una repetición directa en lugar de una repetición única del transgén. Sin embargo, los autores sugieren que las repeticiones inversas deberían ser menos capaces de generar resistencia mediada por ARN.

Stam et al. (The Plant Journal, 1997, 12(1):63-82) divulgan que se puede silenciar el gen de la calcona sintasa en *Petunia* mediante loci de ADN T/transgén multimérico como repeticiones inversas. Sin embargo, los autores no sugieren el uso de un transgén que codifica una secuencia de palíndromos interrumpidos. De hecho, los autores sugieren que se puede lograr el silenciado del gen objetivo sin transcripción del transgén y que los transgenes sin promotor pueden inducir el silenciado.

Una comprensión pobre de los mecanismos involucrados en este fenómeno significa que ha habido pocas mejorías en las tecnologías para modular el nivel de la expresión de genes, en particular tecnologías para retardar, reprimir o reducir de alguna otra manera la expresión de genes específicos utilizando tecnología de ADN recombinante. Además, como una consecuencia de la impredecibilidad de estos enfoques, actualmente no existe un medio viable comercialmente para modular el nivel de expresión de un gen específico en un organismo eucariótico o procariótico.

Por lo tanto, existe la necesidad de métodos mejorados para modular la expresión de genes, en particular para reprimir, retardar o reducir de alguna otra manera la expresión de genes en células de mamíferos, con el propósito de introducir rasgos fenotípicos novedosos al mismo. En particular, estos métodos pueden proporcionar un medio general para modificación fenotípica, sin la necesidad de realizar enfoques de direccionamiento de genes concomitantes.

## SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se basa en parte en el descubrimiento sorprendente por los inventores de que las células las cuales muestran uno o más rasgos deseados se pueden producir y seleccionar a partir de células transformadas que comprenden una molécula de ácido nucleico unida operablemente a un promotor, en donde el producto de transcripción de la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica la cual es sustancialmente idéntica a la secuencia nucleotídica de un transcrito de un gen objetivo endógeno o no endógeno, cuya expresión se pretende modular. Las células transformadas se regeneran en tejidos completos, órganos u organismos capaces de exhibir rasgos novedosos, en particular resistencia a virus y expresión modificada de genes endógenos.

En consecuencia, un aspecto de la presente invención proporciona un método para reprimir, retardar o, de otro modo, reducir la expresión de un gen objetivo en una célula eucariótica, comprendiendo dicho método:

- a) seleccionar una molécula de ácido nucleico extraño que comprende múltiples copias de una secuencia de nucleótidos (a) que comprende 100 nucleótidos, la cual es sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos de dicho gen objetivo o de una región de éste, en donde las múltiples copias se presentan como una secuencia palindrómica interrumpida,
- 5 b) producir un gen sintético que comprende la molécula de ácido nucleico extraño operable bajo el control de una única secuencia promotora,
- c) introducir el gen sintético en dicha célula,
- d) expresar el gen sintético en dicha célula,
- 10 en donde la represión, retardo o, de otro modo, reducción de la expresión del gen objetivo no se lleva a cabo solamente por la represión o reducción de la transcripción del gen objetivo, y
- en donde dicho método no es un método de tratamiento del cuerpo humano o animal por cirugía o terapia, ni un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal.
- El gen objetivo puede ser un gen el cual es endógeno a la célula animal o, alternativamente, un gen extraño tal como una secuencia genética viral o extraña, entre otras. Preferiblemente, el gen objetivo es una secuencia genética viral.
- 15 La invención es particularmente útil en la modulación de la expresión de genes eucarióticos, en particular la modulación de la expresión de genes humanos o animales, e incluso de manera más particular en la modulación de expresión de genes derivados de animales vertebrados e invertebrados, tales como insectos, animales acuáticos (por ejemplo peces, mariscos, moluscos, crustáceos tales como cangrejos, langostas y camarones), animales aviares y mamíferos, entre otros.
- 20 Una variedad de rasgos son seleccionables con procedimientos apropiados y con cantidades suficientes de células transformadas. Tales rasgos incluyen, pero no se limitan a rasgos visibles, rasgos de resistencia a enfermedades y rasgos de resistencia a patógenos. El efecto modulador es aplicable a diversos genes expresados en plantas y animales que incluyen, por ejemplo, genes endógenos responsables del metabolismo celular con la transformación celular, que incluye oncogenes, factores de transmisión y otros genes los cuales codifican para polipéptidos involucrados en el
- 25 metabolismo celular.
- Por ejemplo, una alteración en la producción de pigmento en ratones puede ser sometido a ingeniería al dirigir la expresión del gen de tirisinasasa en el mismo. Esto proporciona un fenotipo novedoso de albinismo en ratones negros. Al dirigir genes necesarios para la replicación de virus en una célula vegetal o una célula animal, se puede introducir un constructo genético el cual comprenda copias múltiples de una secuencia nucleotídica que codifique para una replicasa viral, polimerasa, proteína de cubierta o un gen de eliminación de recubrimiento o proteasa de proteína, en una célula en
- 30 donde se exprese, para conferir inmunidad contra el virus ante la célula.
- Al llevar a cabo la presente invención, la molécula extraña de ácido nucleico generalmente comprenden una secuencia nucleotídica que tiene más de aproximadamente 85% de identidad con la secuencia del gen objetivo, sin embargo, una homología mayor puede introducir una modulación de expresión más efectiva de la secuencia del gen objetivo. Se prefiere sustancialmente una homología mayor, de más de aproximadamente 90%, e incluso de manera más preferible de aproximadamente 95% para identidad absoluta, la cual es deseable.
- 35 La secuencia de molécula de ácido nucleico extraña introducida, necesita menos que la homología absoluta, y tampoco necesitan ser de longitud completa, en relación ya sea al producto de transcripción primario o al ARNm completamente procesado del gen objetivo. Una homología mayor en una secuencia de longitud menor que la completa compensa una secuencia homóloga menos larga. Además, la secuencia introducida no necesita tener el mismo patrón de intrón o exón, y la homología de los segmentos no codificantes será igualmente efectiva. Normalmente, se puede utilizar una secuencia mayor de 20-100 nucleótidos, aunque se prefiere una secuencia de más de aproximadamente 200-300 nucleótidos, y se prefiere especialmente una secuencia de más de 500-1000 nucleótidos, dependiendo del tamaño del gen objetivo.
- 40 Un segundo aspecto de la presente invención proporciona un gen sintético el cual es capaz de reprimir, retardar o, de otro modo, reducir la expresión de un gen objetivo en una célula eucariótica, en donde dicho gen sintético comprende una molécula de ácido nucleico extraño que comprende múltiples copias de una secuencia de nucleótidos (a) que comprende 100 nucleótidos, la cual es sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos de dicho gen objetivo o de una región de éste, en donde las múltiples copias se presentan como una secuencia palindrómica interrumpida, y el ácido nucleico extraño es operable bajo la acción de una única secuencia promotora.
- 45 El gen objetivo puede ser endógeno o no endógeno al genoma de la célula. El gen sintético de acuerdo con la invención puede comprender además un terminador, el cual es operable en dicha célula eucariótica. Preferentemente, el terminador es activo en una célula vegetal.
- La presente invención también se refiere a una composición que comprende el gen sintético de acuerdo con la invención en asociación con un portador, excipiente o diluyente.

La presente invención también se refiere a una célula eucariótica aislada que comprende un gen sintético de acuerdo con la invención. La presente invención también se refiere a un organismo transgénico no humano que comprende un gen sintético de acuerdo con la invención.

5 La presente invención también se refiere al uso de un gen sintético de acuerdo con la invención para reprimir, retardar o de otro modo reducir la expresión de un gen objetivo en una célula eucariótica aislada.

La presente invención también se refiere a un gen sintético de acuerdo con la invención de uso en terapia.

10 La presente divulgación proporciona un gen sintético el cual es capaz de modificar la expresión de un gen objetivo en una célula, tejido u órgano de un eucariota el cual se transfiere o transforma con el mismo, en donde el gen sintético comprende por lo menos secuencias genéticas estructurales múltiples, en donde cada una de las secuencias genéticas estructurales se coloca operablemente bajo el control de una secuencia promotora la cual es operable en la célula, tejido u órgano, y en donde cada una de las secuencias de genes estructurales comprende una secuencia nucleotídica la cual es sustancialmente idéntica a la secuencia nucleotídica del gen objetivo o un derivado del mismo, o una secuencia complementaria al mismo.

15 La presente divulgación también proporciona un constructo genético el cual es capaz de modificar la expresión de un gen endógeno o gen objetivo en una célula, tejido u órgano transformado o transfectado, en donde el constructo genético comprende por lo menos un gen sintético de la invención y uno o más orígenes de replicación y/o secuencias de genes marcadores seleccionables.

20 Con el fin de observar muchos rasgos novedosos en organismos multicelulares tales como plantas y animales, en particular aquellos los cuales son específicos de tejido o específicos de órgano o bien regulados por el desarrollo, se requerirá la regeneración de una célula transformada que represente los genes sintéticos y los constructos genéticos descritos aquí en un organismo completo. Aquellos expertos en la técnica se darán cuenta que esto significa hacer crecer un organismo completo a partir de una célula vegetal o una célula animal transformada, o grupo de células, un tejido u órgano. Los métodos estándar para la regeneración de ciertos animales y plantas a partir de células y tejidos aislados se conocen por aquellos expertos en la técnica.

25 En consecuencia, la invención también proporciona una célula, tejido, órgano u organismo no humano eucariótico aislado que comprende dos genes sintéticos y los constructos genéticos descritos en la presente.

#### **DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS**

La figura 1 es una representación diagramática del plásmido pEGFP-N1 MCS.

La figura 2 es una representación diagramática del plásmido pCMV.cass.

30 La figura 3 es una representación diagramática del plásmido pCMV.SV40L.cass.

La figura 4 es una representación diagramática del plásmido pCMV.SV40LR.cass.

La figura 5 es una representación diagramática del plásmido pCR.Bgl-GFP-Bam.

La figura 6 es una representación diagramática del plásmido pBSII(SK+).EGFP.

La figura 7 es una representación diagramática del plásmido pCMV.EGFP.

35 La figura 8 es una representación diagramática del plásmido pCR.SV40L.

La figura 9 es una representación diagramática del plásmido pCR.BEV.1.

La figura 10 es una representación diagramática del plásmido pCR.BEV.2.

La figura 11 es una representación diagramática del plásmido pCR.BEV.3.

La figura 12 es una representación diagramática del plásmido pCMV.EGFP.BEV2.

40 La figura 13 es una representación diagramática del plásmido pCMV.BEV.2.

La figura 14 es una representación diagramática del plásmido pCMV.BEV.3.

La figura 15 es una representación diagramática del plásmido pCMV.VEB.

La figura 16 es una representación diagramática del plásmido pCMV.BEV.GFP.

La figura 17 es una representación diagramática del plásmido pCMV.BEV.SV40L-0.

45 La figura 18 es una representación diagramática del plásmido pCMV.O.SV40L.BEV.

## ES 2 374 534 T3

- La figura 19 es una representación diagramática del plásmido pCMV.0.SV40L.VEB.
- La figura 20 es una representación diagramática del plásmido pCMV.BEVx2.
- La figura 21 es una representación diagramática del plásmido pCMV.BEVx3.
- La figura 22 es una representación diagramática del plásmido pCMV.BEVx4.
- 5 La figura 23 es una representación diagramática del plásmido pCMV.BEV.SV40L.BEV.
- La figura 24 es una representación diagramática del plásmido pCMV.BEV.SV40L.VEB.
- La figura 25 es una representación diagramática del plásmido pCMV.BEV.GFP.VEB.
- La figura 26 es una representación diagramática del plásmido pCMV.EGFP.BEV2.PFG.
- La figura 27 es una representación diagramática del plásmido pCMV.BEV.SV40LR.
- 10 La figura 28 es una representación diagramática del plásmido pCDNA3.Galt.
- La figura 29 es una representación diagramática del plásmido pCMV.Galt.
- La figura 30 es una representación diagramática del plásmido pCMV.EGFP.Galt.
- La figura 31 es una representación diagramática del plásmido pCMV.Galt.GFP.
- La figura 32 es una representación diagramática del plásmido pCMV.Galt.SV40L.0.
- 15 La figura 33 es una representación diagramática del plásmido pCMV.Galt.SV40L.tlaG.
- La figura 34 es una representación diagramática del plásmido pCMV.0.SV40L.Galt.
- La figura 35 es una representación diagramática del plásmido pCMV.Galtx2.
- La figura 36 es una representación diagramática del plásmido pCMV.Galtx4.
- La figura 37 es una representación diagramática del plásmido pCMV.Galt.SV40L.Galt.
- 20 La figura 38 es una representación diagramática del plásmido pCMV.Galt.SV40L.tlaG.
- La figura 39 es una representación diagramática del plásmido pCMV.Galt.GFP.tlaG.
- La figura 40 es una representación diagramática del plásmido pCMV.EGFP.Galt.PFG.
- La figura 41 es una representación diagramática del plásmido pCMV.Galt.SV40LR.
- La figura 42 es una representación diagramática del plásmido pART7.
- 25 La figura 43 es una representación diagramática del plásmido pART7.35S.SCBV.cass.
- La figura 44 es una representación diagramática del plásmido pBC.PVY.
- La figura 45 es una representación diagramática del plásmido pSP72.PVY.
- La figura 46 es una representación diagramática del plásmido pClapBC.PVY.
- La figura 47 es una representación diagramática del plásmido pBC.PVYx2.
- 30 La figura 48 es una representación diagramática del plásmido pSP72.PVYx2.
- La figura 49 es una representación diagramática del plásmido pBC.PVYx3.
- La figura 50 es una representación diagramática del plásmido pBC.PVYx4.
- La figura 51 es una representación diagramática del plásmido pBC.PVY.LNYV.
- La figura 52 es una representación diagramática del plásmido pBC.PVY.LNYV.PVY.
- 35 La figura 53 es una representación diagramática del plásmido pBC.PVY.LNYV.YVPΔ.
- La figura 54 es una representación diagramática del plásmido pBC.PVY.LNYV,YVP.

La figura 55 es una representación diagramática del plásmido pART27.PVY.

La figura 56 es una representación diagramática del plásmido pART27.35S.PVY.SCBV.O.

La figura 57 es una representación diagramática del plásmido pART27.35S.O.SCBV.PVY.

La figura 58 es una representación diagramática del plásmido pART27.35S.O.SCBV.YVP.

5 La figura 59 es una representación diagramática del plásmido pART7.PVYx2.

La figura 60 es una representación diagramática del plásmido pART7.PVYx3.

La figura 61 es una representación diagramática del plásmido pART7.PVYx4.

La figura 62 es una representación diagramática del plásmido pART7.PVY.LNYV.PVY.

La figura 63 es una representación diagramática del plásmido pART7.PVY.LNYV.YVPΔ.

10 La figura 64 es una representación diagramática del plásmido pART7.PVY.LNYV.YVP.

La figura 65 es una representación diagramática del plásmido pART7.35S.PVY.SCBV.YVP.

La figura 66 es una representación diagramática del plásmido pART.35S.PVYx3.SCBV.YVPx3.

La figura 67 es una representación diagramática del plásmido pART7.PVYx3.LNYV.YVPx3.

La figura 68 es una representación diagramática del plásmido pART7.PVYMULTI.

## 15 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona un método para reprimir, retardar o, de otro modo, reducir la expresión de un gen objetivo en una célula eucariótica, comprendiendo dicho método:

20 e) seleccionar una molécula de ácido nucleico extraño que comprende múltiples copias de una secuencia de nucleótidos (a) que comprende 100 nucleótidos, la cual es sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos de dicho gen objetivo o de una región de éste, en donde las múltiples copias se presentan como una secuencia palindrómica interrumpida,

f) producir un gen sintético que comprende la molécula de ácido nucleico extraño operable bajo el control de una única secuencia promotora,

g) introducir el gen sintético en dicha célula,

25 h) expresar el gen sintético en dicha célula,

en donde la represión, retardo o, de otro modo, reducción de la expresión del gen objetivo no se lleva a cabo solamente por la represión o reducción de la transcripción del gen objetivo, y en donde dicho método no es un método de tratamiento del cuerpo humano o animal por cirugía o terapia, ni un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal.

30 .

Por el término "copias múltiples" se quiere significar que dos o más copias del gen objetivo se presentan en conexión física cercana o se yuxtaponen, en orientación igual o diferente, en la misma molécula de ácido nucleico, opcionalmente separadas por un fragmento de relleno o región intergénica para facilitar la formación de una estructura secundaria entre cada sección repetida en donde se requiera. El fragmento de relleno puede comprender cualquier combinación de

35 residuos nucleotídicos.

Preferiblemente, el fragmento de relleno comprende una secuencia de nucleótidos.

De manera más preferible, el fragmento de relleno comprende una secuencia de nucleótido de por lo menos aproximadamente 10-50 nucleótidos de longitud, incluso de manera más preferible por lo menos aproximadamente 50-100 nucleótidos de longitud, y de manera aún más preferible por lo menos aproximadamente 100-500 nucleótidos de

40 longitud.

En donde la molécula extraña de ácido nucleico comprende secuencias de unión de empalme de intrón/exón, el fragmento de relleno puede servir como una secuencia intrón colocada entre el sitio de empalme 3' del gen estructural más cerca del extremo 5' de gen y el sitio de empalme 5' de la siguiente unidad hacia el extremo 3' del mismo. Alternativamente, cuando es deseable que se traduzcan más de dos unidades de secuencias nucleotídicas adyacentes de la molécula extraña de ácido nucleico, el fragmento de relleno colocado entre los mismos no debe incluir un codón de

45

detención de traducción en marco, ausente de secuencias de unión de empalme intrón/exón en ambos extremos del fragmento de relleno o la adición de un codón de inicio de traducción en el extremo 5' de cada unidad, como será evidente para aquellos expertos en la técnica.

5 Los fragmentos de relleno preferidos son aquellos los cuales codifican para proteínas marcadoras detectables o análogos biológicamente activos o derivados de los mismos, por ejemplo luciferasa,  $\beta$ -galacturonasa,  $\beta$ -galactosidasa, cloramfenicol, acetiltransferasa o proteína fluorescente verde, entre otros. No se excluyen fragmentos de relleno adicionales.

10 De acuerdo con esta realización, el marcador detectable o un análogo o derivado del mismo sirve para indicar la expresión del gen sintético de la invención en una célula, tejido u órgano en virtud de su capacidad para conferir un fenotipo detectable específico en el mismo, preferiblemente un fenotipo detectable visualmente.

Como se utiliza aquí, el término "modular" se tomará que indica que la expresión del gen objetivo se reduce en amplitud y/o la sincronización de la expresión del gen se retarda y/o se altera el desarrollo o el patrón específico de tejido o específico de célula de la expresión del gen objetivo, en comparación con la expresión del gen en ausencia del método de la invención descrito aquí.

15 Aunque no se desea limitar el alcance de la invención descrita aquí, la presente invención se dirige a la modulación de la expresión de un gen, la cual comprende la represión, retardo o reducción en amplitud del gen de expresión objetivo en una célula, tejido u órgano especificado de un organismo eucariótico, en particular una planta, tal como una planta monocotiledónea o dicotiledónea, o un humano u otro animal, e incluso de manera más particular un animal vertebrado e invertebrado, tal como un insecto, un animal acuático (por ejemplo pez, marisco, molusco, crustáceo tal como cangrejo, langosta o camarón), un animal aviar o un mamífero, entre otros.

20 De manera más preferible, la expresión del gen objetivo se inactiva completamente por moléculas extrañas de ácido nucleico las cuales se han introducido a la célula, tejido u órgano.

25 Aunque no se desea unirse a ninguna teoría o modo de acción, la expresión reducida o eliminada del gen objetivo la cual resulta del funcionamiento de la invención se puede atribuir a una traducción reducida o retardada del producto de transcripción de ARNm del gen objetivo, o alternativamente, la prevención de traducción de tal ARNm, como consecuencia de la degradación específica de secuencia del transcrito de ARNm del gen objetivo por el sistema de célula huésped endógena.

30 Se prefiere particularmente que, para resultados óptimos, la degradación específica de secuencia del transcrito de ARNm del gen objetivo se produzca ya sea antes del tiempo o etapa cuando el transcrito de ARNm del gen objetivo normalmente se traduce, o alternativamente al mismo tiempo que el transcrito de ARNm del gen objetivo normalmente se traduciría. En consecuencia, la selección de una secuencia promotora apropiada para regular la expresión de la molécula extraña de ácido nucleico es una consideración importante del funcionamiento óptimo de la invención. Por esta razón, los promotores constitutivos fuertes o los sistemas promotores inducibles son especialmente preferidos para el uso en la regulación de la expresión de las moléculas extrañas de ácido nucleico introducidas.

35 La presente invención claramente abarca la expresión reducida, en donde la expresión reducida del gen objetivo se lleva a cabo al disminuir la transcripción, sujeto a la condición de que una reducción en la transcripción no es el único mecanismo mediante el cual esto ocurre y que tal reducción en la transcripción está acompañada por lo menos por una traducción reducida del acumulado de ARNm de estado estable.

40 El gen objetivo puede ser una secuencia genética la cual es endógena a la célula animal o alternativamente, una secuencia genética no endógena, tal como una secuencia genética la cual se deriva de un virus u otro organismo patógeno extraño y que es capaz de entrar a una célula y utilizar la maquinaria de la célula después de la infección.

45 Cuando el gen objetivo es una secuencia genética no endógena para la célula animal, es deseable que el gen objetivo codifique para una función la cual es esencial para la replicación o reproducción del patógeno viral u otro patógeno. En tales realizaciones, la presente invención es particularmente útil en el tratamiento profiláctico y terapéutico de infección viral o una célula animal o para conferir o estimular resistencia contra el patógeno.

Preferiblemente, el gen objetivo comprende una o más secuencias nucleotídicas de un patógeno viral o una célula, tejido u órgano vegetal o animal.

50 Por ejemplo, en el caso de animales y humanos, el patógeno viral puede ser un retrovirus, por ejemplo un lentivirus tal como el virus de inmunodeficiencia, un ARN virus (+) de cadena sencilla tal como el enterovirus bovino (BEV) o el alfavirus Sinbis. Alternativamente, el gen objetivo puede comprender una o más secuencias nucleotídicas de un patógeno viral o una célula, tejido u órgano animal tal como, pero sin limitarse al virus de ADN de cadena doble tal como el virus de herpes bovina o el virus de herpes simplex I (HSV I), entre otros.

55 En el caso de plantas, el patógeno viral es preferentemente un potivirus, caulimovirus, badnavirus, geminivirus, reovirus, rhabdovirus, bunyavirus, tospovirus, tenuivirus, tobusvirus, luteovirus, sobemovirus, bromovirus, cucumovirus, ilavirus, alfamovirus, tobamovirus, tobavirus, potexvirus y clostrovirus tales como, pero sin limitarse a,

CaMV, SCSV, PVX, PVY, PLRV y TMV, entre otros.

5 Con respecto particular a los patógenos virales, aquellos expertos en la técnica saben que las funciones codificadas por virus se pueden complementar *in trans* por polipéptidos codificados por la célula huésped. Por ejemplo, la replicación del genoma de herpes virus bovino en la célula huésped se puede facilitar por ADN polimerasa de célula huésped las cuales son capaces de complementar un gen de polimerasa de ADN viral inactivado.

10 En consecuencia, en donde el gen objetivo es una secuencia genética no endógena para la célula animal, una realización alternativa adicional de la invención proporciona un gen objetivo para codificar para un polipéptido viral o extraño el cual no es capaz de ser complementado por una función de la célula huésped, tal como una secuencia genética específica de virus. Los genes objetivo ejemplares de acuerdo con esta realización de la invención incluyen, pero no se limitan a genes los cuales codifican para proteína de recubrimiento de virus, proteínas de eliminación de recubrimiento y ADN polimerasas dependientes de ARN y ARN polimerasas dependientes de ARNm entre otros.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, el gen objetivo es ARN polimerasa dependiente de ARN de BEV, o un homólogo, análogo o derivado del mismo, o secuencias que codifican PVY Nia proteasas.

15 La célula en la cual la expresión del gen objetivo se modifica por cualquier célula la cual se deriva de un animal o planta multicelular, incluye cultivos de células y tejidos de los mismos. Preferiblemente, la célula animal se deriva de un insecto, reptil, anfibio, ave, humano u otro mamífero. Las células animales ejemplares incluyen fibroblastos de piel cultivados, células neuronales, células somáticas, células pluripotenciales hematopoyéticas, células T y líneas de células inmortalizadas tales como COS, VERO, HeLa, C127 de ratón, células de ovario de Hámster Chino (CHO), células WI-38, 20 líneas de células de riñón de hámster bebe (BHK) o MDBK, entre otras. Tales células y líneas celulares están disponibles fácilmente para aquellos expertos en la técnica. En consecuencia, el tejido u órgano en el cual se modifica la expresión del gen objetivo puede ser cualquier tejido u órgano que comprenda a tales células animales.

Preferentemente la célula vegetal se deriva de especies vegetales monocotiledóneas o dicotiledóneas o de una línea celular derivada de las mismas.

25 Por el término "molécula extraña de ácido nucleico" se quiere significar una molécula aislada de ácido nucleico la cual tiene una o más copias múltiples, preferiblemente secuencias repetidas directas en batería, de una secuencia nucleotídica la cual se origina de la secuencia genética de un organismo el cual es diferente del organismo al cual se introduce la molécula extraña de ácido nucleico. Esta definición abarca una molécula de ácido nucleico la cual se origina de un individuo diferente del mismo agrupamiento taxonómico más bajo (es decir, de la misma población) que el agrupamiento taxonómico al cual se ha introducido la molécula de ácido nucleico, así como una molécula de ácido 30 nucleico la cual se origina de un agrupamiento taxonómico individual o diferente como el agrupamiento taxonómico al cual se ha introducido la molécula de ácido nucleico, tal como un gen derivado de un patógeno viral.

35 En consecuencia, un gen objetivo contra el cual una molécula de ácido nucleico actúa en el funcionamiento de la invención, puede ser una molécula de ácido nucleico la cual se ha introducido desde un organismo a otro organismo utilizando tecnologías de transformación o introgresión. Los genes objetivo ejemplares de acuerdo con esta realización de la invención incluyen el gen que codifica para la proteína fluorescente verde derivada de la medusa *Aequoria victoria* (Prasher et al., 1992; Publicación de patente internacional número WO 95/07463), genes de tirosinasa y en particular el gen de tirosinasa murina (Kwon et al., 1988), el gen *lacI* de *Escherichia coli* el cual es capaz de codificar para un polipéptido represor del gen *lacZ*, el gen de  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa porcina (NCBI, acceso número L36535) 40 ejemplificada en la presente, y los genes estructurales PVY y BEV ejemplificados aquí, o un homólogo, análogo o derivado de tales genes o una secuencia nucleotídica complementaria para los mismos.

La presente invención además es útil para direccionamiento simultáneo de la expresión de varios genes objetivo los cuales se coexpresan en una célula particular, por ejemplo mediante la utilización de una molécula extraña de ácido nucleico la cual comprende secuencias nucleotídicas las cuales son sustancialmente idénticas a cada uno de los genes coexpresados objetivo.

45 Por "sustancialmente idénticas" se quiere significar que la molécula extraña de ácido nucleico introducida de la invención y la secuencia del gen objetivo son lo suficientemente idénticos a nivel de secuencia nucleotídica para permitir apareamiento de bases entre ellos bajo condiciones intracelulares estándar.

50 Preferiblemente, la secuencia nucleotídica de cada secuencia repetida en la molécula extraña de ácido nucleico de la invención y la secuencia nucleotídica de una parte de la secuencia del gen objetivo son por lo menos aproximadamente 80-85% idénticas a nivel de la secuencia nucleotídica, de manera más preferible por lo menos aproximadamente 85-90% idénticas, incluso de manera más preferible por lo menos aproximadamente 90-95% idénticas y de manera aún más preferible por lo menos 95-99% o 100% idénticas a nivel de secuencia nucleotídica.

55 Sin importar que la presente invención no esté limitada por el número preciso de secuencias repetidas en la molécula extraña de ácido nucleico de la invención, se debe entender que la presente invención requiere por lo menos dos copias de la secuencia del gen objetivo que se va a expresar en la célula.

Las copias múltiples de la secuencia de gen objetivo se presentan en la molécula extraña de ácido nucleico como

secuencias repetidas invertidas en batería. Tales configuraciones se ejemplifican por los "plásmidos de prueba" descritos aquí que comprenden las regiones de los genes Galt, BEV o PVY.

Preferiblemente, la molécula extraña de ácido nucleico la cual se introduce a la célula, tejido u órgano comprende ARN o ADN.

5 Preferiblemente, la molécula extraña de ácido nucleico comprende además una secuencia nucleotídica o su secuencia complementaria a un nucleótido, la cual es capaz de codificar para una secuencia de aminoácidos codificada por el gen objetivo. De manera incluso más preferible, la molécula de ácido nucleico incluye uno o más codones de inicio traduccional ATG o AUG.

10 Los métodos estándar se pueden utilizar para introducir la molécula extraña de ácido nucleico dentro de la célula, tejido u órgano para propósitos de modular la expresión del gen objetivo. Por ejemplo, se puede introducir la molécula de ácido nucleico como ADN o ARN desnudo, opcionalmente encapsulado en un liposoma, en una partícula de virus como un virus atenuado o asociada con un recubrimiento de virus o una proteína de transporte o un portador inerte tal como oro, o como un vector viral recombinante o como un vector bacteriano, o como un constructo genético, entre otros.

El medio de administración incluye inyección e ingestión oral (por ejemplo, material alimenticio medicado) entre otros.

15 Las moléculas sujeto de ácido nucleico también se pueden suministrar por un sistema de suministro in vivo por ejemplo mediante la utilización de un sistema de expresión bacteriana optimizado para su expresión en bacterias, la cual se puede incorporar en la flora de intestino. Alternativamente, se puede utilizar un sistema de expresión viral. A este respecto, una forma de expresión viral es la administración de un vector vivo generalmente por aspersión, alimentación o agua en donde la cantidad efectiva infectante del vector vivo (por ejemplo un virus o bacteria) se proporciona al animal.  
20 Otra forma de sistema de expresión viral es un vector de virus no replicante el cual es capaz de infectar una célula pero no replicarse en el mismo. El vector viral no replicante proporciona un medio para introducirse al material genético del sujeto humano o animal para expresión transitoria en el mismo. El modo de administración de tal vector es el mismo que el del vector viral vivo.

25 Los portadores, excipientes y/o diluyentes utilizados para suministrar las moléculas sujeto de ácido nucleico a una célula huésped deben ser aceptables para aplicaciones humanas o veterinarias. Tales portadores, excipientes o diluyentes son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los portadores o diluyentes adecuados para uso veterinario incluyen cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, soluciones acuosas, revestimientos, agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes isotónicos y de retardo de absorción, y similares. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla el uso del mismo en la composición.  
30 También se puede incorporar en las composiciones ingredientes activos suplementarios.

Para seleccionar frecuencias nucleotídicas apropiadas para dirigir la expresión del gen objetivo, se pueden utilizar varios enfoques. En una realización, se pueden clonar copias múltiples de regiones específicas de genes caracterizados en conexión operable con un promotor adecuado y se pueden ensayar para determinar la eficacia en reducir la expresión del gen objetivo. Alternativamente, se pueden producir y ensayar bibliotecas de escopeta (shotgun) que comprenden copias  
35 múltiples de secuencias genéticas para determinar su eficacia y reducir la expresión del gen objetivo. La ventaja asociada con esta última solución es que no es necesario tener ningún conocimiento previo de la importancia de algún gen objetivo particular para especificar un fenotipo indeseable en la célula. Por ejemplo, las bibliotecas de escopeta comprenden fragmentos subgenómicos de virus los cuales se pueden utilizar y probar lentamente para determinar su capacidad para conferir inmunidad viral en la célula huésped del animal, sin conocimiento previo del papel el cual cualquier gen de virus juega en la patogénesis de la célula huésped.  
40

Como se utiliza en la presente, el término "biblioteca escopeta" es un conjunto de diversas secuencias nucleotídicas en donde cada miembro del conjunto está contenido preferiblemente dentro de un plásmido, cósmido, bacteriófago o molécula vector de virus adecuada, la cual es adecuada para mantenimiento y/o replicación en un huésped celular. El término "biblioteca de escopeta" incluye una biblioteca representativa, la cual la extensión de diversidad entre las  
45 secuencias nucleotídicas es numerosa de manera que todas las secuencias en el genoma del organismo del cual se derivan las secuencias nucleotídicas están presentes en el "conjunto" o alternativamente, una biblioteca limitada en la cual existe un grado menor de diversidad entre tales secuencias. El término "biblioteca de escopeta" abarca además secuencias nucleotídicas aleatorias, en donde la secuencia nucleotídica comprende fragmentos de genoma viral o celular, entre otros obtenidos, por ejemplo, por corte o digestión parcial del ADN genómico utilizando endonucleasas de restricción, entre otros enfoques. Una "biblioteca de escopeta" incluye además células, partículas virales y partículas de  
50 bacteriófago que comprende las secuencias nucleotídicas individuales del conjunto diverso.

Las bibliotecas de escopeta preferidas de acuerdo con esta realización de la invención son "bibliotecas representativas" que comprenden un conjunto de secuencias nucleotídicas repetidas en tándem derivadas de un patógeno viral de un animal o una planta.

55 En una realización particularmente preferida de la invención, la biblioteca de escopeta comprende células, partículas virales o partículas de bacteriófago que comprenden un conjunto diverso de secuencias nucleotídicas repetidas en batería las cuales codifican para un conjunto diverso de secuencias de aminoácidos en donde el miembro de conjunto diverso de secuencias nucleotídicas se colocan operablemente bajo el control de una secuencia promotora la cual es

capaz de dirigir la expresión de la secuencia nucleotídica repetida en batería en la célula.

En consecuencia, la secuencia nucleotídica de cada unidad en la secuencia repetida en batería puede comprender por lo menos aproximadamente 1 a 200 nucleótidos de longitud. El uso de fragmentos más grandes, particularmente utilizando ácido nucleico cortado aleatoriamente derivado de genomas virales, vegetales o animales, no se excluye.

5 La molécula introducida de ácido nucleico está en una forma expresable.

10 Por el término "forma expresable" se quiere significar que la molécula sujeta de ácido nucleico está presente en un arreglo de manera que se puede expresar en la célula, tejido, órgano o en todo el organismo, por lo menos a nivel transcripcional (es decir, está presente en la célula animal para proporcionar por lo menos un producto de ARNm el cual es opcionalmente traducible o se traduce para producir una molécula peptídica, oligopeptídica o polipeptídica recombinante).

15 Con el fin de obtener la expresión de la molécula extraña de ácido nucleico en la célula, tejido u órgano de interés, se produce un gen sintético o un constructo genético que comprende tal gen sintético, en donde el gen sintético comprende una secuencia nucleotídica como se describe *supra* en conexión operable con una secuencia promotora la cual es capaz de regular la expresión en la misma. Por lo tanto, la molécula sujeta de ácido nucleico se conectará operablemente a uno o más segmentos reguladores suficientes para que se produzca la transcripción eucariótica.

La presente divulgación proporciona un método para modular la expresión de un gen objetivo en una célula, tejido u órgano animal, el método comprende por lo menos las etapas de:

20 (i) seleccionar una o más moléculas extrañas de ácido nucleico las cuales comprenden copias múltiples, preferiblemente secuencias repetidas en batería, de una secuencia nucleotídica la cual es sustancialmente idéntica a la secuencia nucleotídica del gen objetivo o de una región del mismo o la cual es complementaria al mismo;

(ii) producir un gen sintético que comprende moléculas extrañas de ácido nucleico;

(iii) introducir el gen sintético a la célula, tejido u órgano, y

25 (iv) expresar el gen sintético en la célula, tejido u órgano durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la traducción del producto de ARNm del gen objetivo que se va a modificar, subsometido a la condición de que la transcripción de tal producto de ARNm no se expresa o reduce exclusivamente.

La referencia en la presente a "gen" o "genes" se toma en su contexto más amplio e incluye:

(i) un gen genómico clásico que consiste de secuencias reguladora transcripcional o traduccional, o una región codificante o secuencias no traducidas (es decir, intrones, secuencias no traducidas 5' y 3') o todo lo anterior; o

30 (ii) ARNm o ADNc que corresponde a las regiones codificantes, es decir, exones, y secuencias no traducidas 5' y 3' del gen; o

(iii) una región estructural que corresponde a las regiones codificantes (es decir, exones), que opcionalmente comprenden además secuencias no traducidas o una secuencia promotora heteróloga la cual consiste de regiones transcripcionales o traduccionales reguladoras capaces de conferir características de expresión sobre la región estructural, o todo lo anterior.

35 El término "gen" también se utiliza para describir moléculas sintéticas o de fusión que codifican para la totalidad o parte de un producto funcional, en particular un producto de ARNm directo o antisentido, o un péptido, oligopéptido o polipéptido, o una proteína biológicamente activa.

40 El término "gen sintético" se refiere a un gen que no se presenta de manera natural como se define en lo anterior, el cual preferiblemente comprende por lo menos una o más secuencias reguladoras transcripcionales o traduccionales o ambas, unidas operablemente a una secuencia de gen estructural.

45 El término "gen estructural" se debe considerar que se refiere a una secuencia nucleotídica la cual es capaz de ser transmitida para producir ARNm, y opcionalmente codifica para un péptido, oligopéptido, polipéptido o una molécula de proteína biológicamente activa. Aquellos expertos en la técnica se darán cuenta de que no todo ARNm es capaz de ser traducido en un péptido, oligopéptido, polipéptido o proteína, por ejemplo si el ARNm carece de una señal de inicio de traducción funcional, o alternativamente, si el ARNm es ARNm antisentido. La presente invención abarca claramente genes sintéticos que comprenden secuencias nucleotídicas las cuales no son capaces de codificar para péptidos, oligopéptidos, polipéptidos o proteínas biológicamente activas. En particular, los presentes inventores han encontrado que tales genes sintéticos pueden ser ventajosos para modificar la expresión del gen objetivo en células, tejidos u órganos de un organismo eucariótico.

50 El término "región de gen estructural" se refiere a aquella parte del gen sintético la cual comprende una molécula extraña de ácido nucleico como se describe en la presente, la cual se expresa en una célula, tejido u órgano bajo el control de una secuencia promotora a la cual se conecta operablemente. Un región de gen estructural puede comprender una o

- 5 más moléculas extrañas de ácido nucleico operablemente bajo el control de una única secuencia promotora o de secuencias promotoras múltiples. En consecuencia, la región del gen estructural de un gen sintético puede comprender una secuencia nucleotídica la cual es capaz de codificar para una secuencia de aminoácidos, o que es complementaria a la misma. A este respecto, una región de gen estructural la cual se utiliza en el funcionamiento de la presente invención también puede comprender una secuencia nucleotídica la cual codifica para una secuencia de aminoácidos que aún carece de un codón de inicio de traducción funcional o de un codón de detención de traducción funcional, o de ambos, y como consecuencia, no comprende un marco de lectura abierto completo. En el presente contexto, el término "región de gen estructural" también se extiende a secuencias nucleotídicas no codificantes, tales como secuencias 5' corriente arriba o 3' corriente abajo de un gen, las cuales normalmente se traducirían en una célula eucariótica la cual expresa tal gen.
- 10 En consecuencia, en el contexto de la presente invención, una región de gen estructural también puede comprender una fusión entre dos o más marcos de lectura abierta del mismo gen o de genes diferentes. En tales realizaciones, la invención se puede utilizar para modular la expresión de un gen, al dirigir regiones diferentes no contiguas del mismo, o alternativamente, para modular simultáneamente la expresión de varios genes diferentes, que incluyen genes diferentes de una familia de genes múltiples. En el caso de una molécula de fusión de ácido nucleico la cual es no endógena a la
- 15 célula animal, y que en particular comprende dos o más secuencias nucleotídicas derivadas de un patógeno viral, la fusión puede proporcionar la ventaja adicional de conferir inmunidad simultánea o protección contra varios patógenos, al dirigir la expresión de genes en varios patógenos. Alternativamente, o de manera adicional, la fusión puede proporcionar inmunidad más efectiva contra cualquier patógeno al dirigir la expresión de más de un gen de ese patógeno.
- 20 Las regiones de genes estructurales particularmente preferidas de acuerdo con este aspecto de la invención son aquellas las cuales incluyen por lo menos un marco de lectura abierta traducible, de manera más preferible que incluyen además un codón de inicio traduccional localizado en el extremo 5' del marco de lectura abierta, aunque no necesariamente en la parte 5' terminal de tal región de gen estructural. A este respecto, sin importar que la región de gen estructural pueda comprender por lo menos un marco de lectura abierta traducible o un codón de inicio traduccional AUG o ATG o ambas cosas, la inclusión de tales secuencias de ninguna manera sugiere que la presente invención requiera que se lleve a cabo la traducción de la molécula introducida de ácido nucleico con el fin de modular la expresión del gen objetivo. Aunque no se desea unirse a ninguna teoría o modo de acción, la inclusión de por lo menos un marco de lectura abierta traducible o un codón de inicio traduccional, o ambas cosas, en la molécula sujeto de ácido nucleico, puede servir para incrementar la estabilidad del producto de transcripción de ARNm del mismo, por lo que se mejora la eficiencia de la invención.
- 25 El número óptimo de secuencias de genes estructurales las cuales se pueden involucrar en el gen de síntesis de la presente invención variará considerablemente dependiendo de la longitud de cada una de las secuencias de genes estructurales, su orientación y grado de identidad entre si. Por ejemplo, aquellos expertos en la técnica tendrán conocimiento de la inestabilidad inherente de las secuencias nucleotídicas palindrómicas in vivo y las dificultades asociadas con la construcción de genes sintéticos largos que comprendan secuencias nucleotídicas repetidas invertidas, debido a la tendencia de tales secuencias a recombinarse in vivo. Sin importar tales dificultades, el número óptimo de
- 30 secuencias de genes estructurales que se incluyen en los genes sintéticos de la presente invención se puede determinar empíricamente por aquellos expertos en la técnica sin ninguna experimentación indebida y al seguir los procedimientos estándar tales como la construcción de gen sintético de la invención utilizando líneas de células deficientes en recombinasa, reducir el número de secuencias repetidas a un nivel el cual elimine o minimice los fenómenos de recombinación y al mantener la longitud total de la secuencia del gen estructural múltiple en un límite aceptable, preferiblemente no mayor de 5-10 kb, de manera más preferible no mayor de 2-5 kb, e incluso de manera más preferible no mayor de 0.5-2.0 kb de longitud.
- 35 Cuando la región del gen estructural comprende más de una molécula extraña de ácido nucleico, se le denominará en la presente como una "región de gene estructural múltiple" o un término similar. La presente invención claramente se extiende al uso de regiones de genes estructurales múltiples las cuales comprenden una secuencia repetida invertida o una secuencia palindrómica interrumpida de un gen estructural particular, una molécula extraña de ácido nucleico, o un fragmento de la misma.
- 40 Cada molécula extraña de ácido nucleico contenida dentro de la unidad del gen estructural múltiple del gen sintético objetivo puede comprender una secuencia nucleotídica la cual es sustancialmente idéntica a un gen objetivo diferente en el mismo organismo. Tal arreglo puede ser de utilidad particular cuando el gen sintético se diseña para proporcionar protección contra un patógeno en una célula, tejido u órgano, en particular un patógeno viral, al modificar la expresión de los genes objetivo virales. Por ejemplo, el gen estructural múltiple puede comprender secuencias nucleotídicas (es decir, dos o más moléculas extrañas de ácido nucleico) las cuales sin sustancialmente idénticas a dos o más genes objetivo seleccionado de la lista que comprenden ADN polimerasa, ARN polimerasa, Nia proteasa y proteína de recubrimiento u otro gen objetivo el cual es esencial para la infectividad, replicación o reproducción virales. Sin embargo, se prefiere dentro de este arreglo que las unidades de gen estructural se seleccionen de manera que los genes objetivo a los cuales son sustancialmente idénticos, normalmente se expresen aproximadamente al mismo tiempo (o posteriormente) en una célula, tejido u órgano infectado en vez del gen estructural múltiple del gen sintético sujeto que se expresa bajo el control de la secuencia promotora. Esto significa que la expresión que controla el promotor del gen estructura múltiple habitualmente se selecciona para conferir expresión en la célula, tejido u órgano sobre todo el ciclo de vida del virus, cuando los genes objetivo virales se expresan en diferentes etapas de infección.
- 45
- 50
- 55
- 60 Al igual que las unidades de secuencia individuales de una molécula extraña de ácido nucleico, las unidades individuales

del gen estructural múltiple se pueden conectar espacialmente cabeza a cabeza o cola a cola, y todas las configuraciones están dentro del alcance de la invención.

5 Para expresión en células eucarióticas el gen sintético comprende además de la molécula de ácido nucleico de la invención, un promotor y opcionalmente otras secuencias reguladoras diseñadas para facilitar la expresión de la molécula extraña de ácido nucleico.

10 La referencia en la presente a un "promotor" se debe tomar en su contexto más amplio e incluye las secuencias reguladoras transcripcionales de un gen genómico clásico, que incluyen la caja TATA la cual es necesaria para un inicio de transcripción preciso, con o sin la secuencia de la caja CCAAT y cualquier elemento regulador adicional (es decir, secuencias activadores hacia el extremo 5' alargadores y silenciadores), los cuales puedan alterar la expresión del gen en respuesta a estímulos de desarrollo o externos o ambos, o de una manera específica de tejido. Un promotor de manera habitual, aunque no necesariamente, se coloca hacia el extremo 5' de una región de gen estructural, la expresión del cual regula. Además, los elementos reguladores que comprenden un promotor habitualmente se colocan dentro de los siguientes 2 kb del sitio de inicio de transcripción del gen.

15 En el presente contexto, el término "promotor" también se utiliza para describir una molécula sintética o de fusión, o un derivado el cual confiere, activa o mejora la expresión de una molécula de ácido nucleico en una célula.

20 Los promotores preferidos pueden contener copias adicionales de uno o más elementos reguladores específicos, para alargar adicionalmente la expresión de la molécula directa o para alterar la expresión espacial, o alterar la expresión temporal de la molécula directa, o todo lo anterior, por ejemplo, los elementos reguladores los cuales confieren capacidad de inducción de cobre se pueden colocar adyacentes a una secuencia promotora heteróloga que activa la expresión de una molécula objetivo, por lo que confieren capacidad de inducción de cobre sobre la expresión de tal molécula.

25 La colocación de una molécula extraña de ácido nucleico bajo el control regulador de una secuencia promotora significa colocar la molécula de manera que la expresión esté controlada por la secuencia promotora. Los promotores habitualmente se colocan hacia el extremo 5' (corriente arriba) de los genes que controlan. En la construcción de combinaciones heterólogas de genes promotores/estructurales, generalmente se prefiere colocar el promotor a una distancia del sitio de inicio de transcripción del gen que sea aproximadamente la misma que la distancia entre el promotor y el gen que controla en su colocación natural, es decir, del gen del cual se deriva el promotor. Como se conoce en la técnica, se puede adaptar cierta variación en la distancia sin pérdida de la función promotora. Similarmente, la colocación preferida del elemento de secuencia reguladora con respecto a un gen heterólogo que se va a colocar bajo su control se define por la colocación del elemento en su ámbito natural, es decir, los genes de los cuales se derivan. Nuevamente, se conoce en la técnica que también puede ocurrir cierta variación en esta distancia.

30 Los ejemplos de promotores adecuados para uso en los genes sintéticos de la presente invención incluyen promotores derivados de virus, hongos, bacterias, animales y plantas capaces de funcionar en células de plantas, animales, insectos, hongos o levaduras. El promotor puede regular la expresión del componente del gen estructural de manera constitutiva, o diferencialmente con respecto a la célula, el tejido u órgano en el cual se produce la expresión o, con respecto a la etapa de desarrollo en la cual se produce la expresión, o en respuesta a los estímulos externos tales como tensiones fisiológicas, o patógenos, o iones metálicos, entre otros.

35 Preferiblemente, el promotor es capaz de regular la expresión de una molécula de ácido nucleico en una célula, tejido u órgano eucariótico, por lo menos durante el período de tiempo sobre el cual se expresa el gen objetivo en el mismo, y de manera más preferible también inmediatamente precedente al inicio de la expresión detectable del gen objetivo en la célula, tejido u órgano.

40 En consecuencia, los promotores constitutivos fuertes se prefieren particularmente para propósitos de la presente invención o los promotores los cuales pueden ser inducidos por infección viral o el comienzo de una expresión de gen objetivo.

45 Los promotores operables por plantas y operables por animales son particularmente preferidos para uso en los genes sintéticos de la presente invención. Los ejemplos de promotores preferidos incluyen al promotor T7 de bacteriófago, promotor T3 de bacteriófago, promotor SP6, promotor tardío SV40, promotor temprano SV40, promotor RSV-LTR, promotor IE de CMV, promotor 35s de CamV, promotor SCSV, promotor SCBV y similares.

50 En consideración del requerimiento preferido para la expresión a alto nivel la cual coincide con la expresión del gen objetivo o que precede la expresión del gen objetivo, es altamente deseable que la secuencia promotora sea un promotor fuerte constitutivo tal como el promotor CMV-IE de la secuencia promotora temprana de SV40, la secuencia promotora tardía de SV40, el promotor 35S de CamV, o el promotor SCBV entre otros. Aquellos expertos en la técnica se darán cuenta fácilmente de las secuencias promotoras adicionales diferentes a las descritas específicamente.

55 En el presente contexto los términos "en conexión operable con" o "operablemente bajo el control de" o similares se deben tomar para indicar que la expresión de la región del gen estructural o la región del gen estructural múltiple está bajo el control de la secuencia promotora con la cual se conecta espacialmente; en una célula, tejido, órgano u organismo completo.

En una realización preferida de la invención, una región del gen estructural (es decir, una molécula extraña de ácido nucleico) o una región de gen estructural múltiple se coloca operablemente en conexión con un promotor de orientación en relación a la secuencia promotora de manera que cuando se transcribe un producto de ARNm es sintetizado el cual, si se traduce, es capaz de codificar para un producto polipeptídico del gen objetivo o un fragmento del mismo.

5 Sin embargo, la presente invención no se limita al uso de tal arreglo y la invención claramente se extiende al uso de genes sintéticos y constructos genéticos en donde la región de gen estructural o la región de gen estructural múltiple se coloca en la orientación "antisentido" en relación a la secuencia promotora, de manera que por lo menos parte del producto de transcripción de ARNm del mismo es complementario al ARNm codificado por el gen objetivo o un fragmento del mismo.

10 Claramente, como la molécula extraña de ácido nucleico o la región de gen estructural múltiple comprende secuencias repetidas invertidas, en batería del gen objetivo, todas las combinaciones de las configuraciones mencionadas antes están abarcadas por la invención.

El gen sintético preferiblemente contiene elementos reguladores adicionales para transcripción eficiente, por ejemplo, una secuencia de terminación de transcripción.

15 El término "terminador" se refiere a una secuencia de ADN en el extremo de una unidad transcripcional la cual indica la terminación de transcripción. Los terminadores son secuencias de ADN 3' no traducidas que contienen una señal de poliadenilación, lo que facilita la adición de secuencias poliadeniladas hacia el extremo 3' de un transcrito primario. Los terminadores activos en células vegetales son conocidos y están descritos en la bibliografía. Se pueden aislar de bacterias, hongos, virus, animales o plantas, o se sintetizan *de novo*.

20 Al igual que con las secuencias promotoras, el terminador puede ser cualquier secuencia terminadora la cual sea operable en las células, tejidos u órganos eucarióticos en los cuales se pretende que se utilice.

Los ejemplos de terminadores particularmente adecuados para uso en los genes sintéticos en la presente invención incluyen la señal de poliadenilación de SV40, la señal de poliadenilación TK de HSV, el terminador CYC1, el terminador ADH, el terminador SPA, el terminador del gen de la nopalina sintasa (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens*, el terminador del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el terminador del gen *zein* de *Zea mays*, las secuencias del terminador del gen de la subunidad pequeña del gen (SSU) del Rubisco y los terminadores de secuencias del gen del virus del enanismo del trébol (SCSV).

25

En una realización particularmente preferida, el terminador es la señal de poliadenilación de SV40 o la señal de poliadenilación de TK de HSV, las cuales son operables en células, tejidos y órganos animales, o el terminador de la octopina sintasa (OCS) o la nopalina sintasa (NOS) activo en células, tejidos y órganos vegetales.

30

Aquellos expertos en la técnica reconocerán que las secuencias terminadoras adicionales las cuales son adecuadas para uso en la realización de la invención. Tales secuencias se pueden utilizar fácilmente sin ninguna experimentación indebida.

Los medios para introducir (es decir, transfectar o transformar) células con los genes sintéticos descritos aquí o un constructo genético que comprende al mismo, son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

35

Los genes sintéticos descritos *supra* son capaces de ser modificados adicionalmente, por ejemplo por la inclusión de secuencias nucleotídicas marcadoras que codifican para una enzima marcadora detectable o un análogo funcional o derivado del mismo, para facilitar la detección del gen sintético en una célula, tejido u órgano en el cual se expresa. De acuerdo con esta realización, las secuencias nucleotídicas marcadoras estarán presentes en un formato traducible y se expresan, por ejemplo, como un polipéptido de fusión con la traducción de producto o productos de cualquiera uno o más genes estructurales, o alternativamente como un polipéptido que no es de fusión.

40

Aquellos expertos en la técnica serán capaces de saber como producir los genes sintéticos descritos aquí y de los requerimientos para obtener la expresión de los mismos, cuando así se desee, en una célula o tipo de célula específica bajo las condiciones deseadas. En particular, se sabrá por aquellos expertos en la técnica que las manipulaciones genéticas necesarias para llevar a cabo la presente invención pueden requerir la propagación de un constructo genético descrito aquí o un derivado del mismo en una célula procariótica tal como una célula de *E. coli* o una célula vegetal o bien una célula animal.

45

Los genes sintéticos de la presente invención se pueden introducir en una célula, tejido u órgano eucariótico adecuado sin modificación como ADN lineal en forma de un constructo genético, opcionalmente contenido dentro de un portador adecuado, tal como una célula, partícula viral o liposoma, entre otros. Para producir un constructo genético, el gen sintético de la invención se inserta dentro de un vector o molécula de episoma adecuado, tal como un vector de bacteriófago, vector viral o un plásmido, cósmido o vector de cromosoma artificial el cual es capaz de ser mantenido, replicado o expresado, o todo lo anterior, en la célula huésped, tejido u órgano en el cual se introduce subsecuentemente.

50

En consecuencia, un aspecto adicional de la invención proporciona un constructo genético el cual comprende por lo menos el gen sintético de acuerdo con cualquiera de una o más de las realizaciones descritas aquí, y uno o más orígenes

55

de replicación o secuencias de genes marcadores seleccionables, o ambas cosas.

Los constructos genéticos son particularmente adecuados para la transformación de una célula eucariótica para introducir rasgos genéticos novedosos a la misma, además de proporcionar características de resistencia a patógenos virales. Tales rasgos novedosos adicionales se pueden introducir en un constructo genético separado o alternativamente en el mismo constructo genético el cual comprende los genes sintéticos descritos aquí. Aquellos expertos en la técnica reconocerán las ventajas importantes, en particular en términos de manipulaciones genéticas reducidas y requerimientos de cultivo dirigido y una efectividad mejorada en cuanto a costos, de incluir secuencias genéticas las cuales codifican para tales rasgos adicionales y los genes sintéticos descritos aquí en un constructo genético único.

Habitualmente, un origen de replicación o un gen marcador seleccionable, adecuado para uso en bacterias, se separa físicamente de aquellas secuencias genéticas contenidas en el constructo genético las cuales se pretende que se expresen o transfieran a una célula eucariótica, o que se integren en el genoma de una célula eucariótica.

En una realización particularmente preferida, el origen de replicación es funcional en una célula bacteriana, y comprende el pUC o el origen ColE1, o alternativamente el origen de replicación es operable en una célula eucariótica, un tejido y más preferiblemente comprende el origen de replicación de 2 micras (2 $\mu$ m) o el origen de replicación de SV40.

Como se utiliza en la presente, el término "gen marcador seleccionable" incluye cualquier gen que confiera un fenotipo en una célula en el cual se exprese para facilitar la expresión o selección, o ambas cosas, de las células las cuales son transfectadas o transformadas con un constructo genético de la invención o un derivado del mismo.

Los genes marcadores seleccionables adecuados contemplados en la presente incluyen el gen de resistencia a (Amp<sup>r</sup>), gen de resistencia a tetraciclina (Tc<sup>r</sup>), gen de resistencia bacteriana a canamicina (Kan<sup>r</sup>) y el gen de resistencia a Zeocin (Zeocin es un medicamento de la familia de bleomicina el cual es una marca comercial de InVitrogen Corporation), el gen *AURI-C* el cual confiere resistencia al antibiótico aureobasidina A, el gen de resistencia a fosfotricina, el gen de neomicina fosfotransferasa (nptII), el gen de resistencia a higromicina, el gen de  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), el gen de cloramfenicol acetiltransferasa (CAT), el gen que codifica para la proteína fluorescente verde o el gen para luciferasa, entre otros.

Preferiblemente, el gen marcador seleccionable es el gen nptII o el gen Kan<sup>r</sup>, o el gen que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP).

Aquellos expertos en la técnica reconocerán otros genes marcadores seleccionables útiles en el funcionamiento de la presente invención, y la presente invención no se limita por la naturaleza del gen marcador seleccionable.

La presente invención se extiende a todos los constructos genéticos esencialmente como se describe en la presente, los cuales incluyen secuencias genéticas adicionales diseñadas para el mantenimiento o replicación, o ambas cosas, del constructo genético en procariotas o eucariotas, o la integración del constructo genético o una parte del mismo en el genoma de una célula u organismo eucariótico, o todo lo anterior.

Al igual que con las moléculas extrañas de ácido nucleico, los métodos estándar descritos *supra* se pueden utilizar para introducir genes sintéticos y constructos genéticos dentro de la célula, tejido u órgano eucariótico con el propósito de modular la expresión del gen objetivo, por ejemplo, transfección o transformación mediada por liposoma, transformación de células con partículas de virus atenuados o células bacterianas, coincidencia de células, procedimientos de transformación o transfección conocidos por aquellos expertos en la técnica o descritos por Ausubel et al., (1992).

Un medio adicional para introducir ADN recombinante en tejido o células vegetales incluye, pero no se limita a transformación utilizando CaCl<sub>2</sub> y variaciones del mismo, en particular el método descrito por Hananan (1983), captación directa de ADN en protoplastos (Krens et al., 1982; Paszkowski et al., 1984), captación mediada por PEG a protoplastos (Armstrong et al., 1990), bombardeo de micropartículas, electroporación (Fromm et al., 1985), microinyección de ADN (Crossway et al., 1986), bombardeo por micropartículas de tejido de explantas o células (Christou et al., 1988; Stanford, 1988), infiltración al vacío de tejido con ácido nucleico, o en el caso de plantas, transferencia mediada por ADN T de *Agrobacterium* al tejido vegetal, según describe esencialmente An et al. (1985), Herrera-Estrella et al. (1983a, 1983b, 1985).

Para el bombardeo con micropartículas de las células, una micropartícula es impulsada dentro de una célula para producir una célula transformada. Cualquier metodología y aparato de transformación de célula balística adecuada se puede utilizar para llevar a cabo la presente invención. Los aparatos y procedimientos ejemplares se describen por Stomp et al., (patente U.S. número 5,122,466) y Sanford y Wolf (patente U.S. número 4,945,050). Cuando se utilizan procedimientos de transformación balísticos, el constructo genético puede incorporar un plásmido capaz de replicarse en la célula que se va a transformar.

Los ejemplos de micropartículas adecuadas para uso en tales sistemas incluyen esferas de oro de 1 a 5  $\mu$ m. El constructo de ADN se puede depositar sobre la micropartícula por cualquier técnica adecuada, tal como por precipitación.

En una realización adicional de la presente invención, los genes sintéticos y los constructos genéticos descritos aquí se adaptan para integración en el genoma de una célula en la cual se expresan. Aquellos expertos en la técnica reconocerán

que, con el fin de obtener integración de una secuencia genética o un constructo genético dentro del genoma de una célula huésped, se pueden requerir ciertas secuencias genéticas adicionales. En el caso de plantas, generalmente se requerirán secuencias del borde derecho e izquierdo del ADN T del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.

5 La presente invención se extiende adicionalmente a una célula, tejido u órgano aislado que comprende el gen sintético descrito en la presente o un constructo genético que comprende al mismo. La presente invención se extiende adicionalmente a tejidos, órganos y organismos completos regenerados no humanos, derivados de tales células, tejidos y órganos y a propágulos y progenie de los mismos.

10 Por ejemplo, las plantas se pueden regenerar a partir de células, tejidos u órganos vegetales transformados en un medio que contenga hormonas y las plantas regeneradas pueden presentar varias formas, tales como quimeras de células transformadas y de células no transformadas; clones transformantes (p. ej., todas las células transformadas para contener el casete de expresión); injertos de tejidos transformados y no transformados (p. ej., un portainjerto transformado injertado a un vástago no transformado en especies cítricas). Las plantas transformadas se pueden propagar mediante varios métodos, tales como mediante técnicas de propagación clonal o de mejora clásica. Por ejemplo, se puede autofertilizar una primera generación (o T1) de plantas transformadas para obtener plantas transformadas homocigóticas de segunda generación (o T2), y las plantas T2 se pueden propagar adicionalmente mediante técnicas de mejora clásica.

15 La presente invención se describe adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

## EJEMPLO 1

20 **Constructos genéticos que comprenden secuencias del gen de BEV polimerasa unidos a la secuencia promotora CMV o a la secuencia promotora SV40L, o a ambas**

### 1. Plásmidos Comerciales

#### Plásmido pBluescript II (SK+)

25 El plásmido pBluescript II (SK+) está disponible comercialmente de Stratagene y comprende la secuencia promotora lacZ y el terminador de transcripción lacZ-alfa, con un sitio de clonación múltiple para la inserción de las secuencias del gen estructural en ese lugar. El plásmido comprende además los orígenes ColE1 y fl de replicación y el gen de resistencia a ampicilina.

#### Plásmido pSVL

El plásmido pSVL es obtenible comercialmente de farmacia y sirve como una fuente de la secuencia promotora tardía SV40. La secuencia nucleotídica de pSVL también está disponible públicamente como GenBank acceso número U13868.

#### 30 Plásmido pCR2.1

El plásmido pCR2.1 está disponible comercialmente de Invitrogen y comprende la secuencia promotor lacZ y el terminador de transcripción lacZ- $\alpha$ , con un sitio de clonación para la inserción de secuencias de genes estructurales entre los mismos. El plásmido pCR2.1 se diseña para clonar fragmentos de ácido nucleico en virtud de la parte excedente A que se sintetiza frecuentemente por Taq polimerasa durante la reacción en cadena de polimerasa. Los fragmentos de PCR clonados de esta manera son flanqueados por dos sitios EcoRI. El plásmido comprende además los orígenes de replicación ColE1 y f1, y los genes de resistencia a canamicina y resistencia a ampicilina.

#### Plásmido pEGFP-N1 MCS

40 El plásmido pEGFP-N1 MCS (figura 1; Clontech) contiene el promotor IE de CMV conectado operablemente a un marco de lectura abierta que codifica para una variante desplazada al rojo de una proteína fluorescente verde de tipo silvestre (GFP; Prasher et al., 1992; Chalfie et al., 1994; Inouye and Tsuji, 1994), la cual se ha optimizado para una fluorescencia más brillante. La variante GFP específica codificada por pEGFP-N1 MCS ha sido descrita por Cormack et al. (1996). El plásmido pEGFP-N1 MCS contiene un sitio de clonación múltiple que comprende sitios BglII y BamHI, y muchos otros sitios de separación de endonucleasa de restricción, localizados entre el promotor CMV IE y el marco de lectura abierta de GFP. Los genes estructurales clonados dentro del sitio de clonación múltiple se expresarán a nivel transcripcional si carecen de un sitio de inicio de traducción funcional, sin embargo, tales secuencias de genes estructurales no se expresarán a nivel de proteína (es decir traducirán). Las secuencias de genes estructurales insertados dentro del sitio de clonación múltiple los cuales comprenden un sitio de inicio de traducción funcional, se expresará como polipéptidos de fusión GFP, si se clonan en marco con la secuencia que codifica para GFP. El plásmido comprende además una señal de poliadenilación SV40 corriente abajo del marco de lectura abierta GFP para dirigir el procesamiento adecuado del extremo 3' del ARNm transcrito a partir de la secuencia promotora CMV-IE. El plásmido comprende además el origen de replicación SV40 funcional en células animales; el gen de resistencia a neomicina que comprende el promotor temprano SV40 (SV40 EP en la figura 1) conectado operablemente al gen de resistencia a neomicina/canamicina derivado de Tn5 (Kan/neo en la figura 1) y la señal de poliadenilación de HSV timidina cinasa (HSV TK poli (A) en la figura 1), para la selección de células transformadas en canamicina, neomicina o G418; el origen de replicación pUC19, el cual es

funcional en células bacterianas (pUC Ori en figura 1); y el origen de replicación f1 para la producción de ADN de cadena sencilla (f1 Ori en la figura 1).

## 2. Casetes de Expresión

### Plásmido pCMV.cass

5 El plásmido pCMV.cass (figura 2) es un casete de expresión para activar la expresión de una secuencia de gen estructural bajo el control de la secuencia promotora CMV-IE. El plásmido pCMV.cass se deriva de pEGFP-NQ MCS por supresión del marco de lectura abierta GFP como sigue: se digiere al plásmido pEGFP-N1 MCS con PinAI y NotI, se forman extremos romos utilizando PfuI polimerasa y después se vuelve a ligar. Las secuencias de gen estructural se clonan en pCMV.cass utilizando el sitio de clonación múltiple, el cual es idéntico al sitio de clonación múltiple de pEGFP-N1 MCS, excepto que carece del sitio PinAI.

### Plásmido pCMV.SV40L.cass

15 El plásmido pCMV.SV40.cass (figura 3) comprende el sitio sintético poli A y la secuencia promotora tardía SV40 a partir del plásmido pCR.SV40L (figura 4) se subclona como un fragmento Sall, dentro del sitio Sall del plásmido pCMV.cass (figura 2) de manera que el promotor CMV-IE y las secuencias del promotor tardío SV40 son capaces de dirigir la transcripción en la misma dirección. En consecuencia, el sitio poli(A) sintético en el extremo 5' de la secuencia promotora SV40 se utiliza como un terminador de transcripción para genes estructurales expresados a partir del promotor CMV IE en este plásmido, el cual también proporciona la inserción de gen estructural vía el sitio de clonación múltiple presente entre el promotor tardío SV40 y el sitio sintético poli(A) (figura 5). Los sitios de clonación múltiple se localizan detrás de CMV-IE y los promotores tardíos SV40, incluyendo los sitios BamHI y BglII.

### Plásmido pCMV.SV40LR.cass

20 El plásmido pCMV.SV40LR.cass (figura 4) comprende la secuencia promotora tardía de SV40 derivada del plásmido pCR.SV40L, subclonada como un fragmento Sall dentro del sitio Sall del plásmido pCMV.cass (figura 2), de manera que el CMV-IE o el promotor tardío de SV40 puede activar la transcripción de un gen estructural o una unidad de gen estructural múltiple, en la orientación directa o antisentido, según se desee. Se coloca un sitio de clonación múltiple entre las secuencias opuestas CMV-IE y el promotor tardío de SV40 en este plásmido, para facilitar la introducción de una secuencia de gen estructural. Con el fin de que se produzca la expresión de una secuencia de gen estructural a partir de este plásmido, se debe introducir con su propia secuencia de terminación de transcripción localizada en el extremo 3', debido a que no hay secuencias de terminación de transcripción localizadas entre las secuencias opuestas de CMV-IE y el promotor tardío de SV40 en este plásmido. Preferiblemente, la secuencia de gen estructural o la unidad de gen estructural múltiple el cual se va a introducir dentro de pCMV.SV40LR.cass comprenderá ambas señales de poliadenilación, 5' y 3', como sigue:

35 (i) cuando la secuencia de gen estructural o la unidad de gen estructural múltiple se va a expresar en la orientación directa a partir de la secuencia promotora de CMV IE o en la orientación antisentido a partir del promotor tardío SV40, la señal de poliadenilación 5' estará en la orientación antisentido y la señal de poliadenilación 3' estará en la orientación directa; y

(ii) cuando la secuencia del gen estructural o la unidad de gen estructural múltiple se va a expresar en la orientación directa a partir de la secuencia promotora CMV IE o en la orientación directa a partir del promotor tardío SV40, o viceversa, la señal de poliadenilación 5' estará en la orientación directa y la señal de poliadenilación 3' estará en la orientación antisentido.

40 De manera alternativa, o además, las secuencias terminadoras orientadas adecuadamente se pueden colocar en el extremo 5' de los promotores CMV y SV40L, como se muestra en la figura 4.

45 Alternativamente, el plásmido pCMV.SV40LR.cass se modifica adicionalmente para producir un plásmido derivado el cual comprende dos señales de poliadenilación localizadas entre las secuencias CMV-IE y promotora tardía de SV40, en orientaciones apropiadas para facilitar la expresión de cualquier gen estructural localizada entre los mismos en la orientación directa o antisentido ya sea desde el promotor CMV IE o la secuencia promotora de SV40. La presente invención claramente abarca tales derivados.

De manera alternativa, los terminadores orientados apropiadamente se pueden colocar hacia el extremo 5' de los promotores CMV y SV40L, de manera que la terminación transcripcional pueda presentarse después de la lectura completa de cada uno de los dos promotores en la orientación antisentido.

## 3. Constructos Intermedios

### Plásmido pCR-Bgl-GFP-Bam

El plásmido pCR-Bgl-GFP-Bam (figura 5) comprende una región interna del marco de lectura abierta de GFP derivado del plásmido pEGFP-N1 MCS (figura 1) colocado operablemente bajo el control del promotor lacZ. Para producir este

plásmido, se amplifica una región del marco de lectura abierta de GFP a partir de pEGFP-N1 MCS utilizando los cebadores de amplificación Bgl-GFP (SEC. DE IDENT. N°.:1 y GFP-Bam (SEC. DE IDENT.N°.: 2), y se clonan en el plásmido pCR2.1. La región codificante de GFP interna en el plásmido pCR.Bgl-GFP.Bam carece de codones de inicio y de detención traduccionales funcionales.

#### 5 **Plásmido pBSII(SK+).EGFP**

El plásmido pBSII(SK+).EGFP (figura 6) comprende el marco de lectura abierta de EGFP derivado del plásmido pEGFP-N1 MCS (figura 1) colocado operablemente bajo el control del promotor lacZ. Para producir este plásmido, se corta la región codificante EGFP de pEGFP-N1 MCS como un fragmento NotI/XhoI y se clona en los sitios de clonación NotI/XhoI del plásmido pBluescript II (SK+).

#### 10 **Plásmido pCMV.EGFP**

El plásmido (figura 7) es capaz de expresar el gen estructural EGFP bajo el control de la secuencia promotora CMV-IE. Para producir este plásmido, la secuencia EGFP del plásmido pBSII(SK+)-EGFP se corta como un fragmento BamHI/SacI y se clona en los sitios BglII/SacI del plásmido pCMV.cass (figura 2).

#### 15 **Plásmido pCR.SV40L**

El plásmido pCR.SV40L (figura 8) comprende el promotor tardío SV40 derivado del plásmido pSVL (GenBank acceso número U13868; Pharmacia), clonado en pCR2.1 (Stratagene). Para producir este plásmido, el promotor tardío SV40 se amplifica utilizando los cebadores SV40-1 (SEC. DE IDENT.N°.:3) y SV40-2 (SEC. DE IDENT.N°.:4), los cuales comprenden sitios de clonación Sall para facilitar el subclonado del fragmento amplificado de ADN dentro de pCMV.cass. El cebador también contiene un sitio poli(A) sintético en el extremo 5', de manera que el producto de amplificación comprende el sitio poli(A) sintético en el extremo 5' de la secuencia promotora SV40.

#### **Plásmido pCR.BEV.1**

La región codificante de ARN polimerasa dependiente de ARN, BEV, se amplifica como un fragmento de ADN de 1385 pb a partir de una clona de ADNc de longitud completa que codifica para la misma, utilizando cebadores denominados BEV-1 (SEC. DE IDENT.N°.:5) y BEV-2 (SEC. DE IDENT.N°.:6), bajo condiciones de amplificación estándar. El ADN amplificado que contiene un sitio de enzima de restricción 5'-BglII, derivado de la secuencia cebadora BEV-1 y un sitio de enzima de restricción 3'-BamHI, derivado de la secuencia cebadora BEV-2. Adicionalmente, dado que la secuencia cebadora BEV-1 contiene una señal de inicio de traducción 5'-ATG-3' sometida a ingeniería en las posiciones 15-17, el gen estructural de polimerasa BEV amplificado comprende el sitio de inicio en marco con las secuencias nucleotídicas que codifican para BEV polimerasa. Por lo tanto, el gen estructural de BEV polímero amplificado comprende el codón de inicio ATG inmediatamente hacia el extremo 5' (es decir, yuxtapuesto) a la secuencia que codifica para BEV polimerasa. No hay un codón de detención de traducción en el ADN amplificado. Este plásmido se presenta como figura 9.

#### **Plásmido pCR.BEV.2**

La región de codificación de polimerasa BEV completa se amplifica a partir de la clona de ADNc de longitud completa que codifica para la misma, utilizando los cebadores BEV-1 y BEV-3. El cebador BEV-3 comprende un sitio de enzima de restricción BamHI en las posiciones 5 a 10 inclusive, y el complemento de una señal de detención de traducción en las posiciones 11 a 13. Como una consecuencia, un marco de lectura abierta comprende una señal de inicio de traducción y una señal de detención de traducción, contenidas entre los sitios de restricción BglII y BamHI. El fragmento amplificado se clona dentro de PCR2.1 (Stratagene) para producir el plásmido pCR2-BEV.2 (figura 10).

#### 40 **Plásmido pCR.BEV.3**

Se amplifica un gen estructural de BEV polimerasa no traducible a partir de una clona de ADNc de BEV polimerasa de longitud completa utilizando los cebadores de amplificación BEV-3 (SEC. DE IDENT.N°.:7) y BEV-4 (SEC. DE IDENT.N°.:8). El cebador BEV-4 comprende un sitio de clonación BglII en posiciones 5-10, y las secuencias hacia el extremo 3' de este sitio BglII son homólogas en las secuencias nucleotídicas del gen de polimerasa BEV. No existe un codón de inicio ATG funcional en el producto de ADN amplificado de los cebadores BEV-3 y BEV-4. La BEV polimerasa se expresa como parte de una poliproteína y, como consecuencia, no hay un sitio de inicio de traducción ATG en este gen. El ADN amplificado se clona en el plásmido pCR2.1 (Stratagene) para proporcionar el plásmido pCR.BEV.3 (figura 11).

#### **Plásmido pCMV.EGFP.BEV2**

50 Se produce el plásmido pCMV.EGFP.BEV2 (figura 12) por clonación de la secuencia de BEV polimerasa a partir de pCR.BEV.2 como un fragmento BglII/BamHI dentro del sitio BamHI de pCMV.EGFP.

#### 4. Control de plásmidos

##### Plásmido pCMV.BEV.2

5 El plásmido pCMV.BEV.2 (figura 13) es capaz de expresar la totalidad del marco de lectura abierta de BEV polimerasa bajo el control de la secuencia promotora CMV-IE. Para producir pCMV.BEV.2 la secuencia de BEV polimerasa a partir de pCR.BEV.2 se subclona en la orientación directa como un fragmento BglII a BamHI dentro de pCMV.cass digerido con BglII/BamHI (figura 2).

##### Plásmido pCMV.BEV.3

10 El plásmido pCMV.BEV.3 (figura 14) expresa un gen estructural de BEV polimerasa no traducible en la orientación directa bajo el control de la secuencia promotora CMV-IE. Para producir pCMV.BEVnt, la secuencia de BEV polimerasa a partir de pCR.BEV.3 se subclona en la orientación directa como un fragmento BglII a BamHI dentro de pCMV.cass digerido con BglII/BamHI (figura 2).

##### Plásmido pCMV.VEB

15 El plásmido pCMV.VEB (figura 15) expresa un ARNm de BEV polimerasa antisentido bajo el control de la secuencia promotora CMV-IE. Para producir el plásmido pCMV.VEB, se subclona la secuencia de BEV polimerasa a partir de pCR.BEV.2 en la orientación antisentido como un fragmento BglII a BamHI dentro de pCMV.cass digerido con BglII/BamHI (figura 2).

##### Plásmido pCMV.BEV.GFP

20 Se construye el plásmido pCMV.BEV.GFP (figura 16) por clonación del fragmento GFP a partir de pCR.Bgl-GFP-Bam como un fragmento BglII/BamHI dentro de pCMV.BEV.2. Este plásmido sirve como un control en algunos experimentos y también como un constructo intermedio.

##### Plásmido pCMV.BEV.SV40-L.0

25 El plásmido pCMV.BEV.SV40-L (figura 17) comprende un gen estructural de BEV polimerasa traducible derivado de plásmido pCR.BEV.2 insertado en la orientación directa entre el promotor CMV-IE y las secuencias promotoras tardías de SV40 del plásmido pCMV.SV40L.cass. Para producir el plásmido pCMV.BEV.SV40-L.0, se subclona el gen estructural de BEV polimerasa como un fragmento BglII a BamHI dentro de ADN pCMV.SV40L.cass digerido con BglII.

##### Plásmido pCMV.O.SV40L.BEV

30 El plásmido pCMV.O.SV40L.BEV (figura 18) comprende un gen estructural de BEV polimerasa traducible, derivado del plásmido pCR.BEV.2 clonado hacia el extremo 3' del promotor CMV-IE en batería en las secuencias promotoras tardías SV40 presentes en el plásmido pCMV.SV40L.cass. Para producir el plásmido pCMV.O.SV40L.BEV, el gen estructural de BEV polimerasa se subclona en la orientación directa como un fragmento BglII a BamHI dentro del ADN pCMV.SV40L.cass digerido con BamHI.

##### Plásmido pCMV.O.SV40L.VEB

35 El plásmido pCMV.O.SV40.VEB (figura 19) comprende un gen estructural de BEV polimerasa antisentido derivado del plásmido pCR.BEV.2 clonado hacia el extremo 3' del promotor CMV-IE en batería y las secuencias promotoras tardías de SV40 presentes en el plásmido pCMV.SV40L.cass. Para producir el plásmido pCMV.O.SV40L.VEB, se subclona el gen estructural de BEV polimerasa en la orientación antisentido como un fragmento BglII a BamHI dentro del ADN pCMV.SV40L.cass digerido con BamHI.

#### 5. Plásmidos de prueba

##### Plásmido pCMV.BEVx2

40 El plásmido pCMV.BEV.x2 (figura 20) comprende una secuencia repetida directa de un marco de lectura abierta de BEV polimerasa completo bajo el control de la secuencia promotora CMV-IE. En células eucarióticas por lo menos, el marco de lectura abierta que se localiza más cerca del promotor CMV-IE es traducible. Para producir pCMV.BEVx2, se subclona el gen estructural de BEV polimerasa a partir del plásmido pCR.BEV.2 en la orientación directa como un fragmento BglII a BamHI dentro de pCMV.BEV.2 digerido con BamHI, inmediatamente hacia el extremo 3' del gen estructural de BEV polimerasa que ya está presente en el mismo.

##### Plásmido pCMV.BEVx3

50 El plásmido pCMV.BEVx3 (figura 21) comprende una secuencia repetida directa de tres marcos de lectura abierta de BEV polimerasa completos bajo el control del promotor CMV-1E. Para producir pCMV.BEVx3, se clona el fragmento de BEV polimerasa a partir de pCR.BEV.2 en la orientación directa como un fragmento BglII/BamHI dentro del sitio BamHI de pCMV.BEVx2, inmediatamente hacia el extremo 3' de las secuencias de BEV polimerasa que ya están presente en el

mismo.

**Plásmido pCMV.BEVx4**

5 El plásmido pCMV.BEVx4 (figura 22) comprende una secuencia repetida directa de cuatro marcos de lectura abierta de BEV polimerasa completos bajo el control del promotor CMV-1E. Para producir pCMV.BEVx4, se clona el fragmento de BEV polimerasa a partir de pCR.BEV.2 en la orientación directa como un fragmento BglII/BamHI dentro del sitio BamHI de pCMV.BEVx3, inmediatamente hacia el extremo 3' de las secuencias de BEV polimerasa que ya están presentes en el mismo.

**Plásmido pCMV.BEV.SV40L.BEV**

10 El plásmido pCMV.BEV.SV40L.BEV (figura 23) comprende una unidad de gen estructural múltiple que comprende dos genes estructurales de BEV polimerasa colocados operable y separadamente bajo el control del promotor CMV-IE y las secuencias promotoras tardías de SV40. Para producir el plásmido pCMV.BEV.SV40L.BEV, el gen estructural de BEV polimerasa traducible presente en pCR.BEV.2 se subclona en la orientación directa como un fragmento BglII a BamHI detrás de la secuencia promotora tardía de SV40 presente en pCMV.BEV.SV40L-O digerido con BamHI.

**Plásmido pCMV.BEV.SV40L.VEB**

15 El plásmido pCMV.BEV.SV40L.VEB (figura 24) comprende una unidad de gen estructural múltiple que comprende dos genes estructurales de BEV polimerasa colocados operable y separadamente bajo el control del promotor CMV-IE y las secuencias promotoras tardías de SV40. Para producir el plásmido pCMV.BEV.SV40L.VEB, el gen estructural de BEV polimerasa traducible presente en pCR.BEV.2 se subclona en la orientación antisentido como un fragmento BglII a BamHI detrás de la secuencia promotora tardía SV40 presente en pCMV.BEV.SV40L-0 digerido con BamHI. En este  
20 plásmido, el gen estructural de BEV polimerasa se expresa en la orientación directa bajo el promotor CMV-IE para producir ARNm traducible, mientras que el gen estructural de BEV polimerasa también se expresa bajo el control del promotor SV40 para producir especies de ARNm antisentido.

**Plásmido pCMV.BEV.GFP.VEB**

25 El plásmido pCMV.BEV.GFP.VEB (figura 25) comprende una secuencia repetida invertida del gen estructural BEV o palíndromo, interrumpido por la inserción de un marco de lectura abierta de GFP (fragmento de relleno) en cada secuencia de gen estructural BEV en la secuencia repetida invertida. Para producir el plásmido pCMV.BEV.GFP.VEB, el fragmento de relleno GFP a partir de pCR.Bgl-GFP-Bam primero se subclona en la orientación directa como un fragmento BglII BamHI dentro de pCMV.BEV.2 digerido con BamHI para producir un plásmido intermedio pCMV.BEV.GFP en donde las secuencias que codifica para BEV polimerasa y que codifica para GFP están contenidos  
30 dentro del mismo fragmento 5'-BglII a BamHI-3'. El gen estructural de BEV polimerasa a partir de pCMV.BEV.2 después se clona en la orientación antisentido como un fragmento BglII a BamHI dentro de pCMV.BEV.GFP digerido con BamHI. El gen estructural de BEV polimerasa más cercano a la secuencia promotora CMV-IE en el plásmido pCMV.BEV.GFP.VEB es capaz de ser traducida, por lo menos en células eucarióticas.

**Plásmido pCMV.EGFP.BEV2.PFG**

35 El plásmido pCMV.EGFP.BEV2.PFG (figura 26) comprende un palíndromo de GFP, interrumpido por la inserción de una secuencia de BEV polimerasa entre cada gen estructural GFP en la secuencia repetida invertida. Para producir este plásmido, el fragmento de GFP a partir de pCR.Bgl-GFP-Bam se clona como un fragmento BglII/BamHI dentro del sitio BamHI de pCMV.EGFP.BEV2 en la orientación antisentido en relación al promotor CMV.

**Plásmido pCMV.BEV-SV40LR**

40 El plásmido pCMV.BEV.SV40LR (figura 27) comprende un gen estructural que comprende la totalidad del marco de lectura abierta de BEV polimerasa colocado operable y separadamente bajo el control del promotor CMV-IE opuesto y las secuencias promotoras tardías SV40, por lo que produce potencialmente transcritos de BEV polimerasa por lo menos desde ambas cadenas del gen estructural de BEV polimerasa de longitud completa. Para producir el plásmido pCMV.BEV.SV40LR, el gen estructural de BEV polimerasa traducible presente en pCR.BEV.2 se subclona como un  
45 fragmento BglII a BamHI dentro del sitio BglII único del plásmido pCMV.SV40LR.cass, de manera que el marco de lectura abierta BEV está presente en la orientación directa en relación a la secuencia promotora CMV-IE.

Aquellos expertos en la técnica reconocerán que es posible generar un plásmido en donde el fragmento de BEV polimerasa a partir de pCR.BEV.2 se inserte en la orientación antisentido, en relación a la secuencia promotora CMV IE, utilizando esta estrategia de clonación.

50 **EJEMPLO 2**

**Constructos genéticos que comprenden la secuencia del gen estructural de  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa porcina (Galt) o secuencias conectadas operablemente a la secuencia promotora CMV o la secuencia promotora SV40 o a ambas**

**1. Plásmidos comerciales****Plásmido pcDNA3**

5 El plásmido pcDNA3 está disponible comercialmente de invitrogen y comprende el promotor CMV-IE y el terminador de transcripción BGHPA, con sitios de clonación múltiples para la inserción de secuencia de genes estructurales entre los mismos. El plásmido comprende además los orígenes de replicación ColE1 y fl y genes de resistencia a neomicina y resistencia a ampicilina.

**2. Plásmidos intermedios****Plásmido pcDNA3.Galt**

10 El plásmido pcDNA3.Galt (BresaGen Limited. South Australia, Australia; figura 28) es un plásmido pcDNA3 (Invitrogen) y comprende la secuencia de ADNc que codifica para el gen de  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa (Galt) unido operablemente bajo el control del promotor CMV-IE de manera que es capaz de ser expresada desde el mismo. Para producir el plásmido pcDNA3.Galt, se clona el ADNc de  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa de gen porcino como un fragmento EcoRI dentro del sitio de clonación EcoRI del pcDNA3. El plásmido comprende además los orígenes de replicación ColE1 y fl, y los genes de resistencia a neomicina y ampicilina.

**15 3. Plásmidos control****Plásmido pCMV.Galt**

El plásmido pCMV.Galt (figura 29) es capaz de expresar el gen estructural Galt bajo el control de una secuencia promotora CMV-IE. Para producir el plásmido pcDNA3.Galt, se corta la secuencia Galt del plásmido pcDNA3.Galt como un fragmento EcoRI y se clona en la orientación directa dentro del sitio EcoRI del plásmido pCMV.cass (figura 2).

**20 Plásmido pCMV.EGFP.Galt**

El plásmido pCMV.EGFP.Galt (figura 30) es capaz de expresar el gen estructural Galt como un polipéptido de fusión Galt bajo el control de la secuencia promotora CMV-IE. Para producir el plásmido pCMV.EGFP.Galt, se corta la secuencia Galt de pCMV.Galt (figura 29) como un fragmento BglII/BamHI y se clona en el sitio BamHI de pCMV-EGFP.

**Plásmido pCMV.Galt.EGFP**

25 Se produce el plásmido pCMV.Galt.GFP (figura 31) por clonación de ADNc de Galt como un fragmento EcoRI a partir de pcDNA3 dentro de pCMV.EGFP digerido con EcoRI en la orientación directa. Este plásmido sirve como control y como constructo intermediario.

**Plásmido pCMV.Galt.SV40L.0**

30 El plásmido pCMV.Galt.SV40L.0 (figura 32) comprende un gen estructural Galt clonado hacia el extremo 3' del promotor CMV presente en pCMV.SV40L.cass. Para producir el fragmento de ADNc de Galt a partir de pCMV.Galt, se clona como BglII/BamHI dentro de pCMV.SV40L.cass digerido con BglII en la orientación directa.

**Plásmido pCMV.O.SV40L.tlaG**

35 El plásmido pCMV.O.SV40L.tlaG (figura 33) comprende clonas de genes estructurales Galt en una orientación antisentido hacia el extremo 3' del promotor SV40L presente en pCMV.SV40L.cass. Para producir este plásmido, el fragmento de ADNc de Galt de pCMV.Galt se clona como BglII/BamHI dentro de pCMV.SV40L.cass digerido en BamHI en la orientación antisentido.

**Plásmido pCMV.O.SV40L.Galt**

40 El plásmido pCMV.O.SV40L.Galt (figura 34) comprende un gen estructural Galt clonado corriente abajo del promotor SV40L presente en pCMV.SV40L.cass. Para producir el plásmido, el fragmento de ADNc de Galt de pCMV.Galt se clona como un fragmento BglII/BamHI dentro de pCMV.SV40L.cass digerido con BamHI en la orientación directa.

**4. Plásmidos de prueba****Plásmido pCMV.Galtx2**

45 El plásmido pCMV.Galtx2 (figura 35) comprende una secuencia repetida directa de un marco de lectura abierta de Galt bajo el control de la secuencia promotora CMV-IE. En células eucariotas por lo menos, el marco de lectura abierto localizado más cerca del promotor CMV-IE es traducible. Para producir pCMV.Galtx2, el gen estructural de Galt de pCMV.Galt se corta como un fragmento BglII/BamHI en la orientación directa dentro del sitio de clonación BamHI de pCMV.Galt.

**Plásmido pCMV.Galtx4**

5 El plásmido pCMV.Galtx4 (figura 36) comprende una secuencia repetida directa cuádruple de un marco de lectura abierta Galt bajo el control de la secuencia promotora CMV-IE. En células eucarióticas por lo menos, el marco de lectura abierta se localiza cerca del promotor CMV-IE el cual es traducible. Para producir pCMV.Galtx4, la secuencia Galtx2 de pCMV.Galtx2 se corta como un fragmento BglII/BamHI y se clona en una orientación directa dentro del sitio de clonación BamHI de pCMV.Galtx2.

**Plásmido pCMV.Galt.SV40.Galt**

10 Se diseña el plásmido pCMV.Galt.SV40L.Galt (figura 37) para que exprese dos transcritos directos de Galt, uno activado por el promotor CMV, el otro por el promotor SV40L. Para producir el plásmido, se clona un fragmento de ADNc de Galt a partir de pCMV.Galt como un fragmento BglII/BamHI dentro de pCMV.O.SV40.Galt digerido con BglII en la orientación directa.

**Plásmido pCMV.Galt.SV40L.tlaG**

15 Se diseña el plásmido pCMV.Galt.SV40.GFP.tlaG (figura 38) para expresar el transcrito directo de Galt activado por el promotor CMV y un transcrito antisentido activado por el promotor SV40L. Para producir el plásmido, se clona un fragmento de ADNc de Galt a partir de pCMV.Galt como un fragmento BglII/BamHI dentro de pCMV.O.SV40.tlaG en la orientación directa.

**Plásmido pCMV.Galt.GFP.tlaG**

20 El plásmido pCMV.Galt.GFP.tlaG (figura 39) comprende un palíndromo de Galt, interrumpido por la inserción de una secuencia GFP entre cada gen estructural Galt en la secuencia repetida invertida. Para producir este plásmido, el fragmento de ADNc de Galt tratado por BglII/BamHI de pCMV.Galt se clona en el sitio BamHI de pCMV.Galt.GFP en antisentido en relación al promotor CMV.

**Plásmido pCMV.EGFP.Galt.PFG**

25 El plásmido pCMV.EGFP.Galt.PFG (figura 40) comprende un palíndromo de GFP, interrumpido por la inserción de una secuencia Galt entre cada gen estructural GFP de la secuencia repetida invertida, la expresión de la cual es activada por el promotor CMV. Para producir este plásmido, se clonan las secuencias de Galt de pCMV.Galt como un fragmento BglII/BamHI dentro de pCMV.EGFP digerido con BamHI en la orientación directa para producir el intermediario pCMV.EGFP.Galt (no mostrado); posterior a esto siguen secuencias GFP adicionales a partir de pCR.Bgl-pCMV.EGFP.Galt en la orientación antisentido.

**Plásmido pCMV.Galt.SV40LR**

30 Se diseña el plásmido pCMV.Galt.SV40LR (figura 41) para expresar secuencias de ADNc Galt clonadas entre los promotores opuestos CMV y SV40L en el casete de expresión pCMV.SV40LR.cass. Para producir este plásmido, se clonan las secuencias Galt de plásmido a partir de pCMV.Galt como un fragmento BglII/BamHI en pCMV.SV40LR.cass digerido con BglII en la orientación directa en relación al promotor 35S.

**Ejemplo 3**

35 **Constructos genéticos que comprenden secuencias PVY Nia unidas operablemente a la secuencia promotora 35S o a la secuencia promotora SCBV, o a ambas**

**1: Vector binario****Plásmido pART27**

40 El plásmido pART27 es un vector binario, diseñado específicamente para ser compatible con el casete de expresión pART7. Contiene los orígenes bacterianos de replicación tanto de E. coli como de Agrobacterium tumefaciens, un gen de resistencia a espectinomicina para selección bacteriana, límites de ADN T izquierdo y derecho para transferencia de ADN de Agrobacterium a células vegetales y un casete de resistencia a canamicina para permitir la selección de células vegetales transformadas. El casete de resistencia a canamicina se localiza entre los límites de ADN T, pART27 también contiene un sitio de restricción NotI único el cual permite la clonación de los constructos preparados en los vectores tales como pART7, se clonan entre los límites de ADN T. La construcción de pART27 se describe en Gleave, AP (1992).

45 Cuando se clonan los insectos NotI dentro de este vector, se pueden obtener dos orientaciones de inserto. En todos los ejemplos siguientes, se elige la misma orientación, en relación a la dirección del promotor 35S en los conductor pART7 descritos; esto se realiza para minimizar cualquier artefacto experimental que pueda surgir al comparar diferentes constructos con diferentes orientaciones de inserto.

50

**2. Plásmidos comerciales**

**Plásmido pCB (KS-)**

5 El plásmido pCB (KS-) está disponible comercialmente de Stratagene y comprende la secuencia promotora lacZ y el terminador de transcripción lacZ-α, con un sitio de clonación múltiple para la inserción de secuencias de genes estructurales en el mismo. El plásmido comprende además los orígenes de replicación ColE1 y fl, y un gen de resistencia a cloramfenicol.

**Plásmido pSP72**

10 El plásmido pSP72 está disponible comercialmente de Promega y contiene un sitio de clonación múltiple para la inserción de secuencias de genes estructurales en el mismo. El plásmido comprende además el origen de replicación de ColE1 y un gen de resistencia a ampicilina.

**3. Casetes de expresión**

**Plásmido pART7**

15 El plásmido pART7 es un casete de expresión diseñado para activar la expresión de secuencias clonadas detrás del promotor 35S. Contiene un polienlazador para ayudar a la clonación, y una región del terminador de octipina sintasa. El casete de expresión 35S está flanqueado por dos sitios de restricción NotI los cuales permiten la clonación en vectores de expresión binarios, de manera que pART7 el cual continúa como un sitio NotI único. Su construcción es como se describe en Gleave, AP (1992), y se muestra un mapa en la figura 42.

**Plásmido pART7.35S.SCBV.cass**

20 El plásmido p35S.CMV.cass se diseña para expresar dos secuencias de genes separadas clonadas en un solo plásmido. Para crear este plásmido, se amplifican por PCR las secuencias correspondientes a los terminadores nos y el promotor SCBV, por PCR y después se clona en el polienlazador de pART7 entre el promotor 35S y OCS.

El plásmido resultante tiene el siguiente arreglo de elementos:

promotor 35S-polienlazador 1-terminador NOS-promotor SCVB-polienlazador 2-terminador OCS.

25 La expresión de las secuencias clonadas dentro del polienlazador 1 están controladas por el promotor 35S, la expresión de las secuencias clonadas en el polienlazador 2 están controladas por el promotor SCBV.

Las secuencias terminadoras NOS se amplifican del plásmido pAHC27 (Christensen and Quail, 1996) utilizando los dos oligonucleótidos;

NOS 5' (cebador directo; SEC. DE IDENT. N°.:9)

5'-GGATTCCCGGGACGTGCGAATTTCCCCGATCGTTC-3'; y

30 NOS 3'(cebador inverso; SEC. DE IDENT. N°.: 10)

5'-CCATGGCCATATAGGCCCGATCTAGTAACATAG-3'

35 Los residuos nucleotídicos 1 a 17 para NOS 5', y 1 a 15 para NOS 3' representan nucleótidos adicionales diseñados para ayudar en la preparación de un constructo al agregar sitios de restricción adicionales. Para NOS 5', estos son BamHI, SmaI, AatII y las primeras 4 bases de un sitio NriI, para NOS 3', estos son sitios NcoI y SfiI. Las secuencias remanentes para cada oligonucleótido son homólogas a los extremos 5' y 3' respectivamente de las secuencias NOS en pAHC 27.

Las secuencias promotoras SCBV se amplifican a partir del plásmido pScBV-20 (Tzafir et al, 1998) utilizando los dos oligonucleótidos:

SCBV 5': 5'-CCATGGCCTATATGGCCATTCCCCACATTCAAG-3'(SEC. DE IDENT.N°.:11); y

SCBV 3': 5'-AACGTTAACTTCTACCCAGTTCAGAG-3'(SEC. DE IDENT.N°.:12)

40 Los residuos nucleotídicos 1 a 17 de SCBV 5' codifican para los sitios de restricción NcoI y SfiI diseñados para ayudar en la preparación de constructos, las secuencias restantes son homólogas a las secuencias hacia el extremo 5' de la región promotora de SCMV. Los residuos nucleotídicos 1 a 9 de SCBV 3' codifican para Psp10461 y los sitios de restricción HpaI diseñados para ayudar en la preparación del constructo, las secuencias restantes son homólogas a lo inverso o al complemento de las secuencias cerca del sitio de inicio de transcripción de SCBV.

45 Las secuencias amplificadas a partir de pScVB-20 utilizando PCR y clonadas en pCR2.1 (Invitrogen) para producir pCR.NOS y pCR.SCBV, respectivamente. Se ligan pCR.NOS cortado con SmaI/SfiI y pCR.SCBV cortado con SfiI/HpaI se ligan en pART7 cortado con SmaI, y un plásmido con una orientación adecuada se elige y se denomina

pART7.35S.SCBV.cass, y un mapa de ese constructo se muestra en la figura 43.

#### 4. Constructos intermediarios

##### Plásmido pBC.PVY

- 5 Una región del genoma PVY se amplifica por PCR utilizando ARN transcrito inverso aislado de tabaco infectado con PVY como una plantilla utilizando protocolos estándar y se clona en un plásmido pGEM 3 (Stratagene) para crear pGEM.PVY. Un fragmento Sall/HindIII de pGEM.PVY, que corresponde a las posiciones de fragmentos Sall/HindIII 1536-2270 de la secuencia O de la cepa PVY (acceso número D12539, GenBank), se subclona después en el plásmido pBC (Stratagene Inc.) para crear pBC.PVY (figura 44).

##### Plásmido pSP72.PVY

- 10 El plásmido pSP72.PVY se prepara al insertar un fragmento EcoRI/Sall a partir de pBC.PVY dentro de pSP72 cortado con EcoI/Sall (Promega). Este constructo contiene sitios de restricción adicionales que flanquean el inserto PVY el cual se utiliza para ayudar a las manipulaciones subsecuentes. En la figura 45 se muestra un mapa de este constructo.

##### Plásmido ClapBC.PVY

- 15 Se prepara el plásmido pBC.PVY al insertar un fragmento ClaI/Sall a partir de pSP72.PVY dentro de pBC cortado con ClaI/Sall (Stratagene). Este constructo contiene sitios de restricción adicionales que flanquean el inserto PVY los cuales utilizan para ayudar en manipulaciones subsecuentes. En la figura 46 se muestra un mapa de este constructo.

##### Plásmido pBC.PVYx2

- 20 El plásmido pBC.PVYx2 contiene dos secuencias repetidas directas, cabeza a cola, de las secuencias pBC.PVY. El plásmido se genera por clonación de un fragmento Accl/ClaI de PVY a partir de pSP72.PVY en pBC.PVY cortado con Accl, y se muestra en la figura 47.

##### Plásmido pSP72-PVYx2

- 25 El plásmido pSP72.PVY.x2 contiene dos secuencias repetidas directas de cabeza a cola de las secuencias PVY derivadas de pCB.PVY. El plásmido se genera por clonación de un fragmento PVY de Accl/ClaI a partir de pBc.PVY dentro de pSP72.PVY cortado con Accl, y se muestra en la figura 48.

##### Plásmido pSP72-PVYx3

- El plásmido pBC.PVYx3 contiene tres secuencias repetidas directas de cabeza a cola de las secuencias PVY derivadas de pCB.PVY. El plásmido se prepara por clonación de un fragmento PVY de Accl/ClaI a partir de pSP72.PVY dentro de pBC.PVYx2 cortado con Accl, y se muestra en la figura 49.

##### Plásmido pSP72-PVYx4

- 30 El plásmido pBC.PVYx4 contiene cuatro secuencias repetidas directas de cabeza a cola de las secuencias PVY derivadas de pCB.PVY. El plásmido se prepara por clonación de la secuencia repetida directa de secuencias PVY a partir de pSP72.PVYx2 como un fragmento Accl/ClaI dentro de pBC.PVYx2 cortado con Accl, y se muestra en la figura 50.

##### Plásmido pBC.PVY.LNYV

- 35 Todos los intentos por crear palíndromos directos de las secuencias PVY fallaron, probablemente debido a que tales arreglos de secuencia son inestables en los huéspedes clonados de E. coli utilizados comúnmente. Sin embargo, los palíndromos interrumpidos demostraron ser estables.

Para crear palíndromos interrumpidos de las secuencias PVY, se inserta un fragmento de "relleno" de aproximadamente 360 pb dentro de pVV.PVY tratado con Cla hacia el extremo 3' de las secuencias PVY. El fragmento de relleno se fabrica como sigue:

- 40 Una clona obtenida inicialmente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir del ARN genómico del virus de amarilleo necrótico de la lechuga (LNYV) (Deitzgen et al., 1989), que se sabe que contiene el gen 4b del virus, se amplifica por PCR utilizando los cebadores:

LNYV 1:5'-ATGGGATCCGTTATGCCAAGAAGAAGGA-3' (SEC. DE IDENT.Nº.:13); y

LNVY 2:5'-TGTGGATCCCTAACGGACCCGATG-3'(SEC. DE IDENT.Nº.:14)

- 45 Los primeros nueve nucleótidos de estos cebadores codifican para un sitio BamHI, los nucleótidos remanentes son homólogas a las secuencias del gen 4b de LNYV.

Después de la amplificación, el fragmento se clona dentro del sitio EcoRI de pCR2.1 (Stratagene). Este fragmento de

EcoRI se clona en el sitio EcoRI de pBC.PVY tratado con Cla, para crear el plásmido intermediario pBC.PVY.LNYV el cual se muestra en la figura 51.

#### **Plásmido pBC.PVY.LNYV.PVY**

5 El plásmido pBC.PVY.LNYV.YVP contiene una secuencia repetida directa interrumpida de secuencias PVY. Para crear este plásmido, se clona un fragmento HpaI/HincII a partir de pSP72 dentro de pbc.pvy.lnyv digerido con SmaI, y un plásmido que contiene la orientación directa aislada, un mapa de este constructo se muestra en la figura 52.

#### **Plásmido pBC.PVY.LNYV.YVPA**

10 El plásmido pBV.PVY.LNYV.YVPA contiene un palíndromo interrumpido parcial de secuencias PVY. Un brazo del palíndromo contiene todas las secuencias PVY a partir de pBC.PVY, el otro brazo contiene parte de las secuencias de PVY, que corresponden a las secuencias entre los sitios EcoRV y HincII de pSP72.PVY. Para crear este plásmido, se clona un fragmento EcoRV/HincII a partir de pSP72.PVY en pBC.PVY.LNYV digerido con SmaI, y un plásmido que contiene la orientación deseada aislado, y un mapa de este constructo se muestra en la figura 53.

#### **Plásmido pBC.PVY.LNYV.YVP**

15 El plásmido contiene un palíndromo interrumpido de secuencias PVY, para crear este plásmido, se clona un fragmento HpaI/HincII de pSP72 en pBC.PVY.LNYV digerido con SmaI y un plásmido que contiene la orientación antisentido aislada, un mapa de este constructo se muestra en la figura 54.

### **5. Plásmidos control**

#### **Plásmidos pART7.PVY y pART7.PVY**

20 El plásmido pART7.PVY (figura 55) se diseña para expresar secuencias de PVY activadas por el promotor 35S. Este plásmido sirve como un constructo control en estos experimentos, contra el cual se comparan todos los demás constructos. Para generar este plásmido, se clona un fragmento ClaI/AccI a partir de ClapBC.PVY dentro de pART7 digerido con ClaI, y se selecciona un plásmido que se espera que exprese una secuencia PVY directa con respecto al genoma de PVY. Las secuencias que consisten del promotor 35S, las secuencias PVY y el terminador OCS se cortan como un fragmento NotI y se clonan en pART27 digerido con NotI, un plásmido con la orientación deseada del inserto se selecciona y se denomina pART27.

#### **Plásmidos pART7.35S.PVY.SCBV.O y pART27.35S.PVY.SCBV.O**

30 Se digiere el plásmido pART7.35S.PVY.SCBV.O (figura 56) para que actúe como un control para la coexpresión de constructos múltiples a partir de un sólo plásmido en plantas transgénicas. Se diseña el promotor 35S para expresar secuencias directas PVY, mientras que el promotor SCBV está vacío. Para generar este plásmido, el fragmento PVY de Cla pBC.PVY se clona como un fragmento XhoI/EcoRI dentro de pART7.35SCBV.cass digerido con XhoI/EcoRI para crear p35SC.PVY.SCBV>O. Las secuencias que consisten del promotor 35S que activa las secuencias PVY directas y el terminador NOS y el promotor SCBV, y el terminador OCS se cortan como un fragmento NotI y se clonan en pART27, un plásmido con la orientación deseada de inserto se aísla y se denomina pART27.35S.PVY.SCBV.O.

#### **Plásmidos pART7.35S.O.SCBV.PVY y pART27.35S.O.SCBV.PVY**

35 El plásmido pART27.35S.O.SCBV.PVY (figura 57) se diseña para actuar como un control adicional para la coexpresión de constructos múltiples a partir de un sólo plásmido en plantas transgénicas. Se clonan secuencias no expresables detrás del promotor 35S, mientras que el promotor SCBV activa la expresión de un fragmento directo PVY. Para generar este plásmido, el fragmento PVY de Cla pBC.PVY se clona como un fragmento ClaI dentro de pART7.35S.SCBV.cass, digerido con ClaI, un plásmido que contiene las secuencias PVY en una orientación directa, se aísla y se denomina p35S.O.SCBV.PVY. Las secuencias que consisten del promotor 35S y el terminador NOS, el promotor SCBV que activa las secuencias PVY directas y el terminador OSC se cortan como un fragmento NotI y se clonan en pART27, un plásmido con la orientación de inserto deseada se aísla y se denomina pART27.35S.O.SCBV.PVY.

#### **Plásmidos pART7.35S.O.SCBV.YVP y pART7.35S.O.SCBV.YVP**

45 Se digiere el plásmido pART7.35S.O.SCBV.YVP (figura 58) para actuar como un control adicional para la coexpresión de constructos múltiples a partir de un sólo plásmido en plantas transgénicas. Las secuencias no expresables se clonan detrás del promotor 35S, mientras que el promotor SCBV activa la expresión de un fragmento antisentido PVY. Para generar este plásmido, el fragmento PVY de Cla pBC.PVY se clona como un fragmento ClaI dentro de p35S.O.SCBV.cass, digerido con ClaI, un plásmido que contiene secuencias PCY en una orientación antisentido, y se aísla y denomina p35S.O.SCBV.YVP. Se cortan las secuencias que consisten del promotor 35S y el terminador NOS, el promotor SCBV activa las secuencias directas PVY y el terminador OSC, como un fragmento NotI y se clonan dentro de pART27, un plásmido con la orientación de inserto deseada se aísla y se denomina pART27.35S.O.SCBV.YVP.

## 6. Plásmidos de prueba

### Plásmidos pART7.PVYx2 y pART27.PVYx2

5 El plásmido pART7.PVYx2 (figura 59) se diseña para expresar una secuencia repetida directa secuencias PVY activas por el promotor 35S en plantas transgénicas. Para generar este plásmido, se clonan secuencias repetidas directas de pBC.PVYx2 como un fragmento XhoI/BamHI dentro de pART7 cortado con XhoI/BamHI. Las secuencias que consisten del promotor 35S, los repetidos directos de PVY y el terminador OSC se cortan como un fragmento NotI a partir de pART7.PVYx2 y se clonan en pART27, digerido con NotI, se selecciona un plásmido con la orientación de inserto deseada y se denomina pART27.PVYx2.

### Plásmidos pART7.PVYx3 y pART27.PVYx3

10 Se diseña el plásmido pART7.PVYx3 (figura 60) para expresar una secuencia repetida directa de tres secuencias PVY activadas por el promotor 35S en plantas transgénicas. Para generar este plásmido, se clonan las secuencias repetidas directas de pBC.PVYx3 como un fragmento XhoI/BamHI dentro de pART7 cortado con XhoI/BamHI. Las secuencias que consisten del promotor 35S, secuencias repetidas directas de PVY y el terminador OSC se cortan como un fragmento NotI a partir de pART.PVYx3 y se clonan en pART27 digerido con NotI, se selecciona un plásmido con la orientación de inserto deseada, y se denomina pART27.PVYx3.

### Plásmidos pART7.PVYx4 y pART27.PVYx4

20 Se diseña el plásmido pART7.PVYx4 (figura 61) para expresar una secuencia repetida directa de cuatro secuencias PVY activadas por el promotor 35S en plantas transgénicas. Para generar este plásmido, se clonan secuencias repetidas directas de pBC.PVYx4 como un fragmento XhoI/BamHI dentro de pART7 cortado con XhoI/BamHI. Se cortan las secuencias que consisten del promotor 35S, las secuencias repetidas directas de PVY y el terminador OCS, como un fragmento NotI a partir de pART7.PVYx3 y se clonan en pART27, digerido con NotI, y se selecciona un plásmido con la orientación de inserto deseada y se denomina pART27.PVYx3.

### Plásmidos pART7.PVY.LNYV.PVY y pART27.PVY.LNYV.PVY

25 Se diseña el plásmido pART7.PVY.LNYV.PVY (figura 62) para expresar la secuencia repetida directa interrumpida de las secuencias PVY activadas por el promotor 35S en plantas transgénicas. Este constructo se prepara al clonar la secuencia repetida directa interrumpida de PVY a partir de pBC.PVY.LNYV.PVY como un fragmento XhoI/XbaI dentro de pART7 digerido con XhoI/XbaI. Las secuencias que consisten del promotor 35S, la secuencia repetida directa interrumpida de las secuencias PVY y el terminador OSC, se cortan a partir de pART7.PVY.LNYV.PVY como un fragmento NotI y se clonan en pART27 digerido con NotI, se selecciona un plásmido con la orientación de inserto deseada, y se denomina pART27.PVY.LNYV.PVY.

### Plásmidos pART7.PVY.LNYV.YVPA y pART27.PVY.LNYV.YVPA

35 Se diseña el plásmido pART7.PVY.LNYV.YVPA (figura 63) para expresar el palíndromo interrumpido parcial de las secuencias PVY activadas por el promotor 35S en plantas transgénicas. Este constructo se prepara al clonar el palíndromo interrumpido parcial de las secuencias PVY a partir de pBC.PVY.LNYV.YVPA como un fragmento XhoI/XbaI dentro de pART7 digerido con XhoI/XbaI. Las secuencias que consisten del promotor 35S, el palíndromo interrumpido parcial de las secuencias PVY y el terminador OSC se cortan del pART7.PVY.LNYV.YVPA como un fragmento NotI y se clonan en pART27, digerido con NotI, se selecciona un plásmido con la orientación de inserto deseada y se denomina pART27.PVY.LNYV.YVP.

### Plásmido pART7.PVY.LNYV.YVP y pART27.PVY.LNYV.YVP

40 Se diseña el plásmido pART7.PVY.LNYV.YVP (figura 64) para expresar el palíndromo interrumpido de las secuencias PVY activadas por el promotor 35S en plantas transgénicas. Este constructo se prepara al clonar el palíndromo interrumpido de secuencias PVY a partir de pBC.PVY.LNYV.YVPA como un fragmento XhoI/XbaI dentro de pART7 digerido con XhoI/XbaI. Las secuencias que consisten del promotor 35S, el palíndromo interrumpido de las secuencias PVY y el terminador OCS se cortan de pART7.PVY.LNYV.YVP como un fragmento NotI y se clonan en pART27, se selecciona el plásmido con la orientación de inserto deseada y se denomina pART27.PVY.LNYV.YVP.

### Plásmido pART7.35S.PVY.SCBV.YVP y pART27.35S.PVY.SCBV.YVP

50 Se diseña el plásmido pART7.35S.PVY.SCBV.YVP (figura 65) para expresar constructos directos y antisentido en plantas transgénicas. Para generar este plásmido, se clona el fragmento PVY de Cla pBC.PVY como un fragmento XhoI/EcoRI dentro de XhoI/EcoRI digerido con p35S.SCBV.O.SCBV.YVP. Las secuencias, que consisten del promotor 35S que activa las secuencias PVY directas y el terminador NOS así como el promotor SCBV que activa PVY antisentido y el terminador OSC, se cortan como un fragmento NotI y se clonan en pART27, se aísla un plásmido con la pART27.35S.PVY.SCBV.YVP

### Plásmidos pART7.35S.PVYx3,SCBV.YVPx3 y pART27.35S.PVYx3,SCBV.YVPx3

5 Se diseña el plásmido pART7.35S.PVYx3,SCBV.YVPx3 (figura 66) para coexpresar secuencias repetidas directas y antisentido de PVY en plantas transgénicas. Para generar este plásmido, se construye el intermediario pART7.35S.O.SCBV.YVPx3 por clonación de una secuencia repetida PVY directa triple a partir de ClapBC.PVYx3 como un fragmento ClaI/AccI dentro de p35S.SCBV.cass digerido con Cla y aislamiento de un plásmido con una orientación antisentido. Para 35S.PVYx3,SCBV.YVPx3 la secuencia repetida PVY directa triple de Cla pBC.PVYx3 se clona como un fragmento KpnI/SmaI dentro de KpnI/SmaI digerido con KpnI/SmaI dentro de p35S.O.SCBV.YVPx3 para crear p35S.PVYx3.SCBV.YVPx3. Las secuencias que incluyen ambos promotores, terminadores y secuencias repetidas de PVY directas se aíslan como un fragmento NotI y se clonan dentro de pART27. Se elige un plásmido con una orientación apropiada, y se denomina pART27.35S.PVYx3.SCBV.

#### 10 **Plásmidos pART7.PVYx3.LNYV.YVPx3 y pART27.PVYx3.LNYV.YVPx3**

15 Se diseña el plásmido pART7.PVYx3.LNYV.YVPx3 (figura 67) para expresar secuencias repetidas triples de secuencias PVY como un palíndromo interrumpido. Para generar este plásmido, se construye un intermediario pART7x3.PVYx3.LNYV.YV por clonación de un fragmento PVY.LNYV.YVP a partir de pBC.PVY.LNYV.YVP como un fragmento AccI/ClaI dentro del plásmido pART7.PVYx2.pART7.35S.PVYx3.LNYV.YVPx3, que se elabora por clonación de una secuencia repetida directa adicional de PVY a partir de pBC.PVYx2 como un fragmento AccI/Call dentro de pART7x3.PVYx3.LNYV.YVP, digerido con ClaI. Las secuencias de pART7.35S.PVYx3.LNYV.YVPx3, que incluyen el promotor 35S, todas las secuencias PVY y el terminador OSC se cortan como un fragmento NotI y se clonan en pART27, digerido con NotI, se elige un plásmido con una orientación apropiada y se denomina pART27.35S.PVYx3.LNYV.

#### **Plásmidos pART7.PVY multi y pART27.PVY multi.**

20 Se diseña el plásmido multi pART7.35S.PVY multi (figura 68) para expresar secuencias repetidas directas de orden superior de regiones de las secuencias PVY en plantas transgénicas. Las secuencias repetidas directas de orden superior de 72 pb de la región PVY Nia de PVY se preparan por reasociación de dos oligonucleótidos parcialmente complementarios, como sigue:

PVY1:

25 5'-TAATGAGGATGATGCCCTACCTTTAATTGGCAGAAATTTCTGTGGAAAGACAG

GGAAATCTTTCCGGCATT-3' (SEC. DE IDENT.Nº.:15); y

PVY2:

5'-TTCTGCCAATTAAGGTAGGGACATCATCCTCATTAAAATGCCGAAAGATT

TCCCTGTCTTTCCACAGAAAT-3' (SEC. DE IDENT.Nº.:16).

30 Los oligonucleótidos se fosforilan con polinucleótido cinasa T4, se calientan y se enfrían lentamente para permitir la autorreasociación, se ligan con ADN ligasa T4, se llenan los extremos con polimerasa Klenow y se clonan en pCR2.1 (Invitrogen). Los plásmidos que contienen secuencias repetidas múltiples se aíslan y las secuencias se clonan como fragmentos EcoRI en una orientación directa dentro de pART7 digerido con EcoRI, para crear pART7.PVY multi intermediario, para crear pART27.PVY multi, el promotor 35S, las secuencias PVY y el terminador OSC se cortan como un fragmento NotI y se clonan dentro de pART27 digerido con NotI. Se aísla un plásmido con la orientación de inserto apropiada y se denomina pART27.PVY multi.

#### **EJEMPLO 4**

##### **Inactivación de la expresión de un gen de virus en mamíferos**

Se generan líneas inmunes virales al expresar secuencias virales en líneas de células transformadas establemente.

40 En particular, se utilizan virus líticos para este enfoque, puesto que la lisis de las células proporciona un análisis muy sencillo y también proporciona la capacidad de seleccionar directamente para los eventos de transformación potencialmente raros los cuales puedan crear inmunidad viral. Los fragmentos subgenómicos derivados de un ARN virus de cadena sencilla, simple (enterovirus bovino-BEV) o un ADN virus de cadena doble, complejo, virus de herpes simplex I (HSV I) se clonan en un vector adecuado y se expresan en células transformadas. Las líneas de células de mamífero se transforman con constructos genéticos diseñados para expresar secuencias virales activadas por el promotor fuerte de citomegalovirus (CMV-IE). Las secuencias utilizadas incluyen genes de replicasa viral específicos. Las bibliotecas de "escopetas" aleatorias que comprenden secuencias de genes virales representativas, también se pueden utilizar y la molécula dispersada introducida de ácido nucleico, hacia el objetivo de la expresión de las secuencias de virus.

50 Los constructos genéticos ejemplares para uso en este procedimiento comprenden secuencias nucleotídicas derivadas del gen de ARN polimerasa, dependiente de ARN, de BEV y se presentan aquí.

Para los constructos de polimerasa viral, se generan grandes cantidades (aproximadamente 100) de líneas de células transformadas y se infectan con el virus respectivo. Para las células transformadas con las bibliotecas de escopeta se

generan cantidades muy grandes (cientos) de líneas transformadas y se analizan en volumen para determinar la inmunidad viral. Posterior a la exposición al virus, se seleccionan las líneas de células resistentes y se analizan adicionalmente para determinar las secuencias que confieren inmunidad a la misma.

5 Las líneas de células resistentes son sustentantes de la capacidad de las secuencias nucleotídicas introducidas para inactivar la expresión de genes virales en un sistema de mamífero.

Adicionalmente, las líneas resistentes obtenidas de tales experimentos se utilizan para definir más precisamente las características moleculares y bioquímicas de la modulación la cual se observa.

#### EJEMPLO 5

##### Inducción de la resistencia de virus en plantas transgénicas

10 Se transforma *Agrobacterium tumefaciens*, cepa LBA4404, independientemente, con los constructos pART27.PVY, pART27.PVYx2, pART27.PVYx3, pART27.PVYx4, pART27.PVY.LNYV.PVY, pART27.PVY.LNYV.YVPΔ, pART27.PVY.LNYV.YVP, pART27.35S.PVY.SCBV.O, pART27.35S.O.SCBV.PVY, pART27.35S.O.SCBV.YVP, pART27.435S.PVY.SCBV.YVP, pART27.35S.PVYx3.SCBV.YVPx3, pART27.PVYx3.LNYV.YVPx3 y pART27.PVYx10, utilizando pareamientos triparentales. Se preparan minipreparaciones de ADN de estas cepas y se examinan por  
15 restricción con NotI para asegurar que contienen los vectores binarios apropiados.

Se transforma *Nicotiana tabacum* (cultivo W38) con estas cepas de *Agrobacterium* utilizando procedimientos estándar. Los brotes transformados putativos se cortan y se siembran en medio que contiene canamicina. Bajo estas condiciones, hemos observado consistentemente que únicamente los brotes transgénicos generan raíces sobre placas de canamicina. Los brotes con raíces se transfieren al suelo y se permite que se establezcan. Después de dos a tres semanas, se escogen plantas vigorosas con por lo menos tres conjuntos de hojas, y se infectan con PVY.  
20

Se prepara el inóculo viral a partir de tabaco W38 previamente infectado con el virus, aproximadamente 2 g de material de hoja, que muestra síntomas virales obvios y se hace crecer con carbarundum en 10 ml de amortiguador de fosfato de Na 100 mM (pH 7.5). El inóculo se diluye a 200 ml con amortiguador de fosfato de Na adicional. Dos hojas de cada planta transgénica se salpican con carbarundum, y después aplican 0.4 ml de inóculo a cada hoja, y las hojas se frotan muy vigorosamente con los dedos. Utilizando este procedimiento, se infectan 100% de plantas control no transgénicas con PVY.  
25

Para realizar un ensayo respecto a la resistencia viral y la inmunidad, se monitorean plantas transgénicas para determinar el desarrollo de síntomas. La cepa PVY (PVY-D, un aislado australiano de PVY) proporciona síntomas evidentes en el tabaco W38, un síntoma de aclaramiento de venas se observa rápidamente en las dos hojas por encima de las hojas inoculadas, y las hojas subsecuentes muestran lesiones cloróticas uniformes. El desarrollo de síntomas se monitorea durante un periodo de seis semanas.  
30

Las líneas transgénicas se describen como resistentes si muestran síntomas virales reducidos los cuales se manifiestan como una reducción en las hojas que muestran lesiones cloróticas. Los intervalos de resistencia, desde una resistencia muy fuerte, fueron únicamente algunas lesiones virales que se observan en una planta, hasta una resistencia débil, la cual se manifiesta con síntomas reducidos en las hojas que se desarrollan posteriormente en el crecimiento de las plantas.  
35

Las plantas transgénicas las cuales no muestran absolutamente evidencia de síntomas virales se clasifican como inmunes. Para asegurar que estas plantas son inmunes, se vuelven a inocular con virus, la mayor parte de las plantas permanecen inmunes, y algunas de estas muestran síntomas y se clasifican como resistentes.

40 Para líneas de plantas generadas, se realiza la prueba de transferencia Southern (Southern blot), y se monitorea la resistencia en generaciones subsecuentes para determinar si la resistencia/inmunidad es transmisible. Adicionalmente se monitorea el espacio de resistencia viral al exponer líneas con otras cepas PVY, para determinar si se ha modificado la susceptibilidad del alcance del huésped.

45 Los resultados de estos experimentos se describen en la Tabla 2. Estos datos indican que los constructos que comprenden secuencias repetidas en batería de la secuencia del gen objetivo, ya sea en la configuración de palíndromos, palíndromos interrumpidos como secuencias repetidas directas, son capaces de conferir resistencia viral y/o inmunidad en plantas transgénicas.

En consecuencia, tales secuencias repetidas invertidas o directas, o ambas, modulan la expresión del gen objetivo del virus en la planta transgénica.

50 Los constructos que combinan el uso de secuencias repetidas directa e inversa, específicamente pART27.35S.PVYx3.SCBV.YVPx3 y pART27.PVYx3.LNYV.YVPx3, también son útiles para modular la expresión de genes.

**EJEMPLO 6**

**Inactivación de Galt en células animales**

5 Para ensayar la inactivación de Galt, se transforman células PK2 porcinas con los constructos relevantes. Las células PK2 expresan constitutivamente la enzima Galt, cuya actividad resulta en la adición de una variedad de grupos  $\alpha$ -1,3-galactosilo a una variedad de proteínas expresadas sobre la superficie celular de estas células. Las células se transforman utilizando lipofectina y se seleccionan líneas transformadas establemente utilizando genetecina.

10 Como un ensayo inicial, se sondan líneas de células para determinar la presencia del epitopo codificado por Galt, es decir, las porciones  $\alpha$ -1,3-galactosilo que decoran a las proteínas de superficie celular, utilizando la lectina IB4. Se realiza el ensayo de unión IB4 ya sea *in situ* o por clasificación FACS. Para la unión *in situ*, las células se fijan a soportes sólidos con metanol frío durante 5 minutos, las células se enjuagan en PBS (solución salina amortiguada con fosfato) y se bloquea la unión IB4 no específica con BSA 1% en PBS durante 10 minutos. Las células fijas se sondan utilizando 20  $\mu$ g/ml de IB4-biotina (Sigma) en BSA 1%, PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, las células se lavan en PBS y después se sondan con una dilución 1:200 de ExtrAvidin-FITC (Sigma) en PBS durante 30 minutos, seguido por enjuagados adicionales en PBS. Las células después se examinan utilizando microscopía de fluorescencia, bajo estas 15 condiciones, la superficie exterior de las células control PK2 se tiñe uniformemente de verde.

20 Para análisis FACS, las células se suspenden después del tratamiento con tripsina, se lavan en HBSS/Hepes (solución salina amortiguada de Hank con Hepes 20 mM, pH 7.4) y se sondan con 10  $\mu$ g/ml de IB4-biotina (Sigma) en HBSS/Hepes durante 45 minutos a 4°C. Las células se lavan en HBSS/Hepes, se sondan con una dilución 1:200 de ExtrAvidin-FITC (Sigma) en HBSS/Hepes durante 45 minutos a 4°C y se enjuagan en HBSS/Hepes antes de la clasificación por FACS.

Utilizando este enfoque, se ensayan líneas de células transformadas para determinar la inactivación de Galt y se determina la asignación cuantitativa de efectividad de constructo. Además, se aíslan líneas de células que muestran inactivación por Galt y se someten a análisis molecular adicional para determinar el mecanismo de inactivación del gen.

| CONSTRUCTO PLASMÍDICO            | Nº. DE PLANTAS PROBADAS | PORCENTAJE DE PLANTAS QUE MUESTRAN FENOTIPO ESPECIFICADO |        |            |
|----------------------------------|-------------------------|--|--------|------------|
|                                  |                         | SUSCEPTIBLE  | INMUNE | RESISTENTE |
| pART27.PVY                       | 19                      | 16   | 1      | 2          |
| pART27.PVYx2                     | 13                      | 5  | 4      | 4          |
| pART27.PVYx3                     | 21                      | 2  | 5      | 14         |
| pART27.PVYx4                     | 21                      | 5  | 7      | 9          |
|                                  |                         |  |        |            |
| pART27.35S.PVY.SCBC.0            | 25                      | 8  | 0      | 17         |
| pART27.35S.0.SCBV.PVY            | 22                      | 8  | 0      | 14         |
| pART27.35S.0.SCBV.YVP            | 18                      | 14   | 0      | 4          |
| pART27.35S.PVY.SCBV.YVP          | 17                      | 3  | 8      | 6          |
|                                  |                         |  |        |            |
| pART27.PVY.LNYV.PVY              | 26                      | 18   | 2      | 6          |
| pART27.PVY.LNYV.YPV              | 20                      | 6  | 10     | 4          |
| pART27.PVY.LNYV.YVP <sub>A</sub> | 18                      | 7  | 11     | 0          |

25

**REFERENCIAS**

1. An *et al.* (1985) *EMBO J* 4:277-284.
2. Armstrong, *et al.* *Plant Cell Reports* 9: 335-339, 1990.
- 5 3. Ausubel, F.M. *et al.* (1987) *In: Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience (ISBN 047140338).
4. Chalfie, M. *et al.* (1994) *Science* **263**: 802-805.
5. Christensen, A.H. y Quail, P.H. (1996) *Transgenic Research* **5**: 213-218.
6. Christou, P., *et al.* *Plant Physiol* 87: 671-674, 1988.
7. Cormack, B. *et al.* (1996) *Gene* **173**: 33-38.
- 10 8. Crossway *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 202:179-185, 1986.
9. Dorer, D.R., y Henikoff, S. (1994) *Cell* **7**: 993-1002.
10. Fromm *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82:5824-5828, 1985.
11. Cleave, A.P. (1992) *Plant Molecular Biology* **20**: 1203-1207.
12. Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* **166**:557-560.
- 15 13. Herrera-Estella *et al.*, *Nature* 303: 209-213, 1983a.
14. Herrera-Estella *et al.*, *EMBO J.* 2: 987-995, 1983b.
15. Herrera-Estella *et al.* *In: Plant Genetic Engineering*, Cambridge University Press, N.Y., pp. 63-93, 1985.
16. Inouye, S. y Tsuji, F.I. (1994) *FEBS Letts.* **341**: 277-280.
17. Jackson, I.J. (1995) *Ann Rev. Genet.* **28**: 189-217.
- 20 18. Krens, F.A. *et al.*, *Nature* 296: 72-74, 1982.
19. Kwon, B.S. *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **153**: 1301-1309.
20. Pal-Bhadra, M. *et al.*, (1997) *Cell* **90**: 479-490.
21. Paszkowski *et al.*, *EMBO J.* 3:2717-2722, 1984
22. Prasher, D.C. *et al.*, (1992) *Gene* **111**: 229-233.
- 25 23. Sanford, J.C. *et al.*, *Particulate Science and Technology* 5: 27-37, 1987.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Benitec Australia Limited  
Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation

<120> Control de la expresión de genes

<130> 129-21 T2

<140>  
<141>

<150> EP 99 910 039.9  
<151> 1999-03-19

<150> PCT/AU99/00195  
<151> 1999-03-19

<150> AU PP2492  
<151> 1998-03-20

<150> AU PP2499  
<151> 1998-03-20

<160> 16

<170> FastSEQ para la versión Windows 4.0

<210> 1  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Virus

<400> 1  
cggcagatct aacaatggca ggacaaatcg agtacatc 38

<210> 2  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Virus

<400> 2  
cccgggatcc tcgaaagaat cgtaccactt c 31

<210> 3  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Virus

<400> 3  
gggcggatcc ttagaaagaa tcgtaccac 29

<210> 4  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Virus

<400> 4  
cggcagatct ggacaaatcg agtacatc 28

<210> 5  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Medusa

<400> 5

agatctgtaa acggccacaa gttcag 26  
 <210> 6  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Medusa  
 <400> 6  
 ggatccttgt acagctcgtc catgcc 26  
 <210> 7  
 <211> 74  
 <212> DNA  
 <213> Virus  
 <400> 7  
 gtcgacaata aaatatcttt attttcatta catctgtgtg ttggtttttt gtgtgatttt 60  
 tgcaaaagcc tagg 74  
 <210> 8  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Virus  
 <400> 8  
 gtcgacgttt agagcagaag taacacttcc g 31  
 <210> 9  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Agrobacterium  
 <400> 9  
 cccggggctt agtgtaaaac aggctgagag 30  
 <210> 10  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Agrobacterium  
 <400> 10  
 cccgggcaaa tcccagtcac ttcttagaaa c 31  
 <210> 11  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Virus  
 <400> 11  
 cggcagatct aacaatggca ggacaaatcg agtacatc 38  
 <210> 12  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Virus  
 <400> 12  
 cccgggatcc tcgaaagaat cgtaccactt c 31  
 <210> 13  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Virus  
 <400> 13  
 gggcggatcc ttagaaagaa tcgtaccac 29  
 <210> 14

ES 2 374 534 T3

<211> 28  
<212> DNA  
<213> Virus

<400> 14  
cggcagatct ggacaaatcg agtacatc 28

<210> 15  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Virus

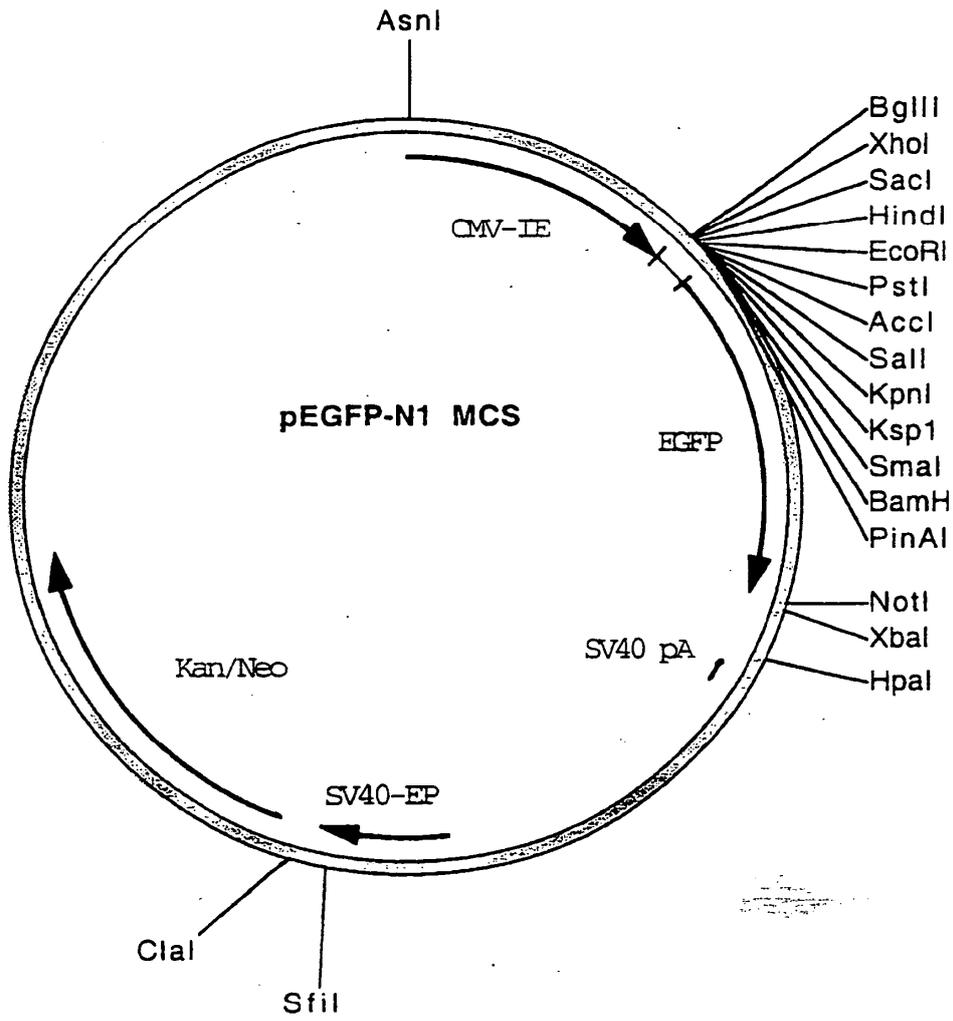
<400> 15  
cccggggctt agtgtaaac aggctgagag 30

<210> 16  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Virus

<400> 16  
cccgggcaaa tcccagtcac ttcttagaaa c 31

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Gen sintético que permite reprimir, retardar o reducir la expresión de un gen objetivo en una célula eucariótica, caracterizado porque el gen sintético comprende una molécula de ácido nucleico extraño que comprende múltiples copias de una secuencia (a) que comprende 100 nucleótidos, la cual es sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleótidos del gen objetivo, en donde las múltiples copias se presentan como una secuencia palindrómica interrumpida, y el ácido nucleico extraño está operablemente bajo el control de una única secuencia promotora.
2. El gen sintético de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el gen objetivo es endógeno al genoma de la célula.
- 10 3. El gen sintético de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el gen objetivo es no-endógeno al genoma de la célula.
4. El gen sintético de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque comprende además un terminador operable en dicha célula eucariótica.
5. El gen sintético de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque dicho terminador es activo en una célula vegetal.
- 15 6. Composición, caracterizada porque comprende el gen sintético de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en asociación con un portador, excipiente o diluyente.
7. Célula eucariótica aislada, caracterizada porque comprende un gen sintético de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 20 8. Organismo transgénico no humano, caracterizado porque comprende un gen sintético de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
9. Uso de un gen sintético de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para reprimir, retardar o reducir la expresión de un gen objetivo en una célula eucariótica aislada.
10. Gen sintético de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para el uso en terapia.
- 25 11. Método para reprimir, retardar o reducir la expresión de un gen objetivo en una célula eucariótica, caracterizado porque comprende:
- i) seleccionar una molécula de ácido nucleico extraño que comprende múltiples copias de una secuencia de nucleótidos (a) que comprende 100 nucleótidos, la cual es sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos del gen objetivo o de una región de éste, en donde las múltiples copias se presentan como una secuencia palindrómica interrumpida,
- 30 ii) producir un gen sintético que comprende la molécula de ácido nucleico extraño operable bajo el control de una única secuencia promotora,
- iii) introducir el gen sintético en dicha célula,
- iv) expresar el gen sintético en dicha célula,
- en donde la represión, retardo o reducción de la expresión del gen objetivo no se lleva a cabo solamente por la represión o reducción de la transcripción del gen objetivo y en donde dicho método no es un método de tratamiento del cuerpo humano o animal por cirugía o terapia, ni un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal.
- 35 12. Método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado además porque el gen objetivo es endógeno a la célula.
13. Método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado además porque el gen objetivo es no-endógeno a la célula.
- 40 14. Método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado además porque la traducción del producto de la transcripción del ARNm del gen objetivo es reducida o retardada.
15. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado además porque el transcripto de ARNm del gen objetivo es degradado de manera específica de secuencia por un sistema de célula huésped endógena.



**FIGURA 1**

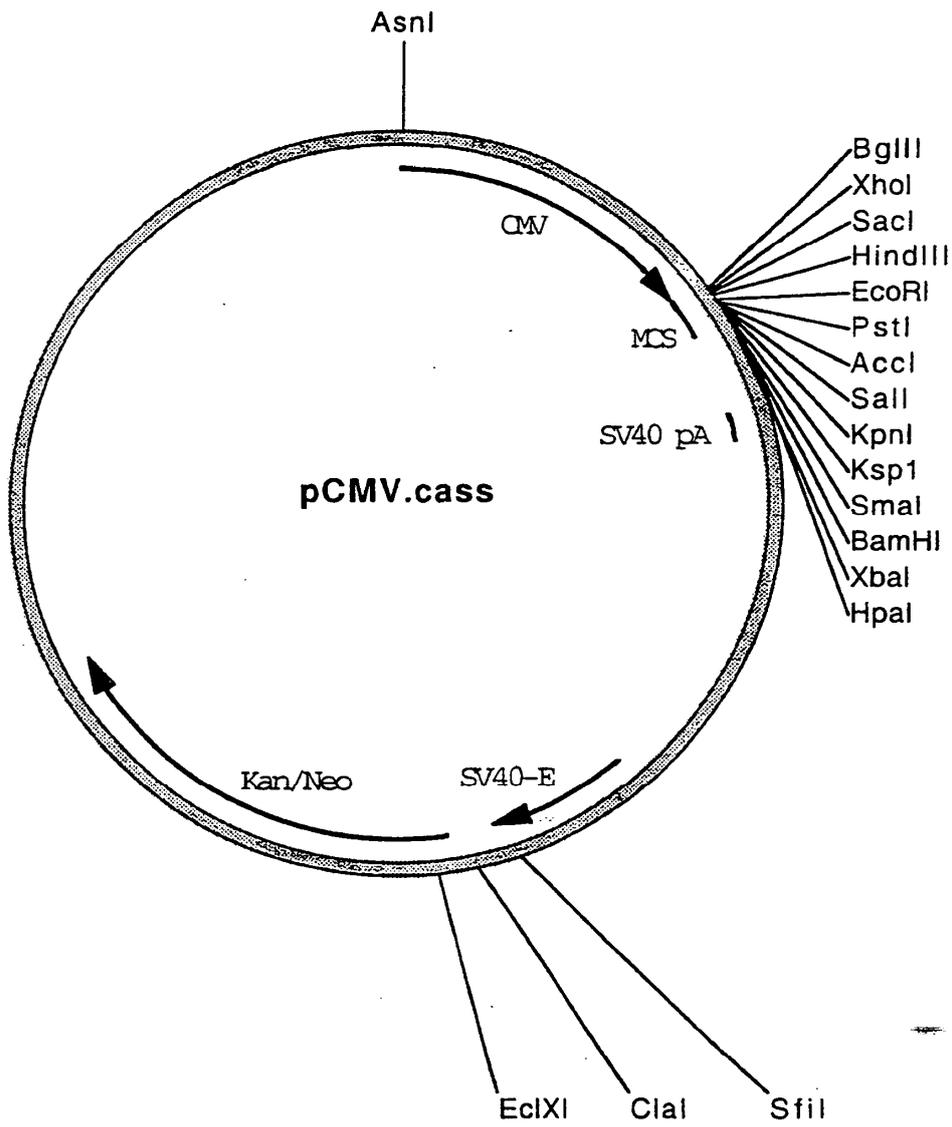
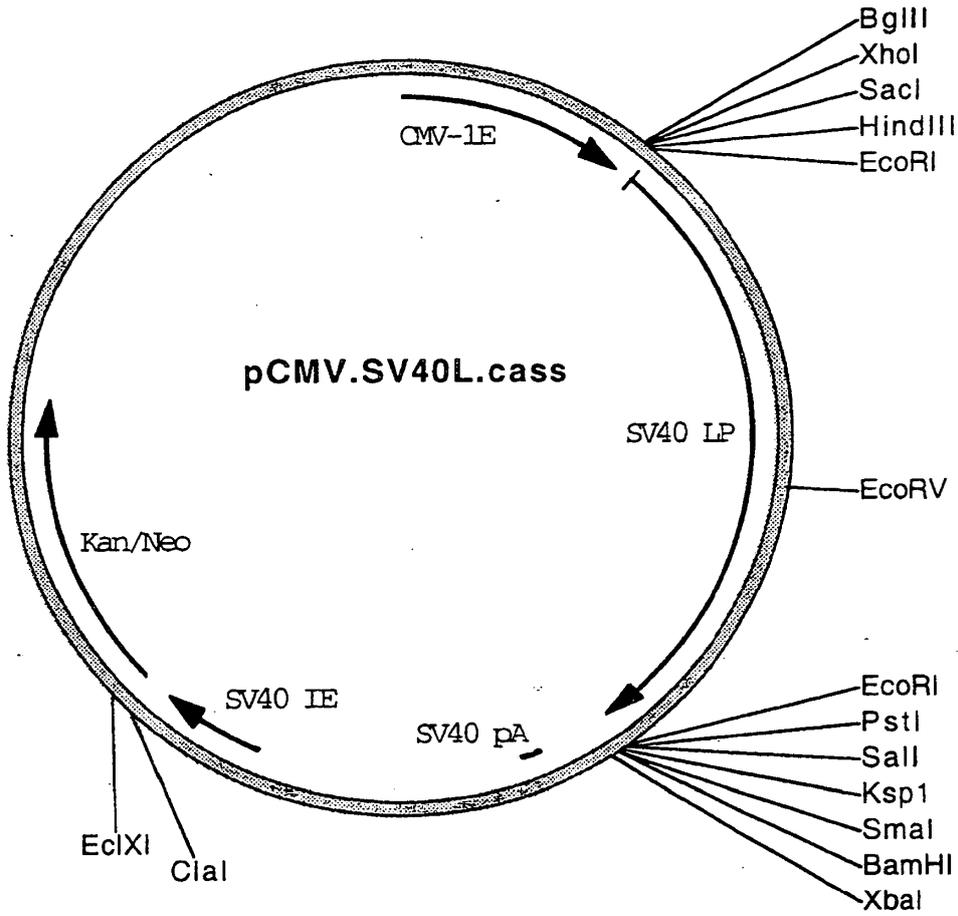
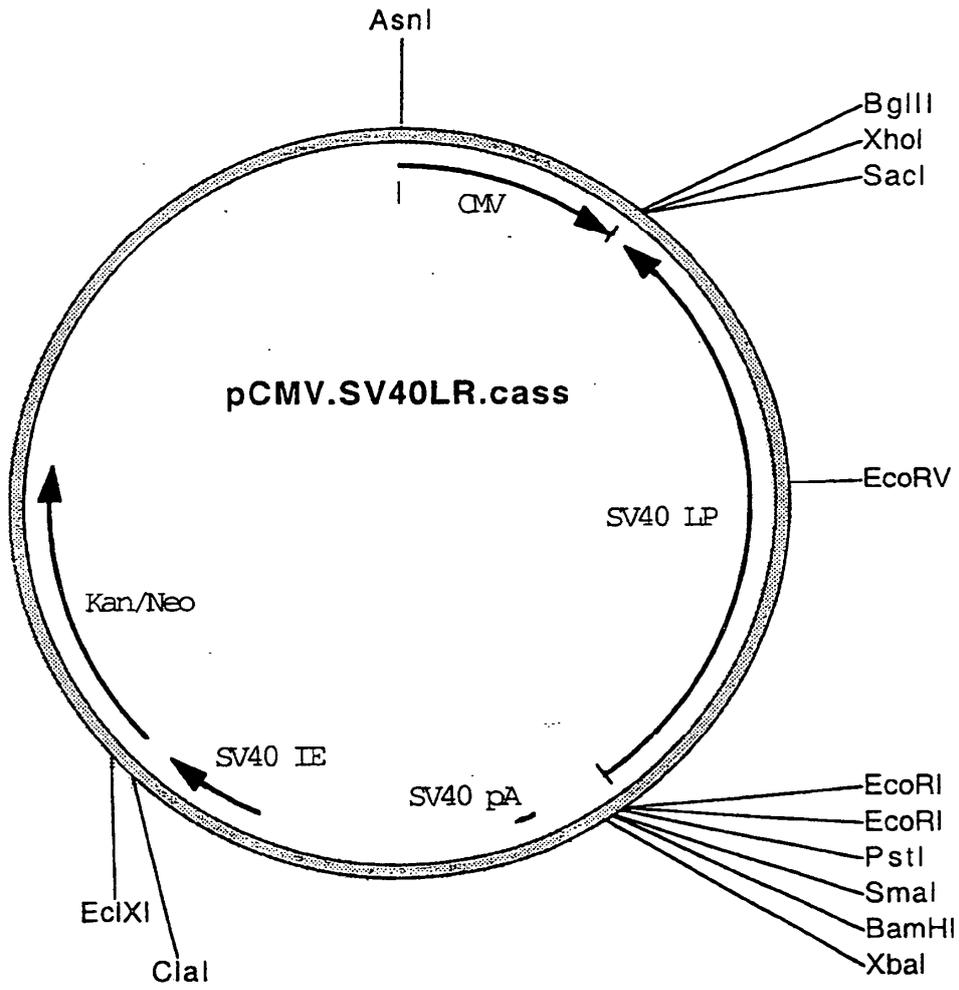


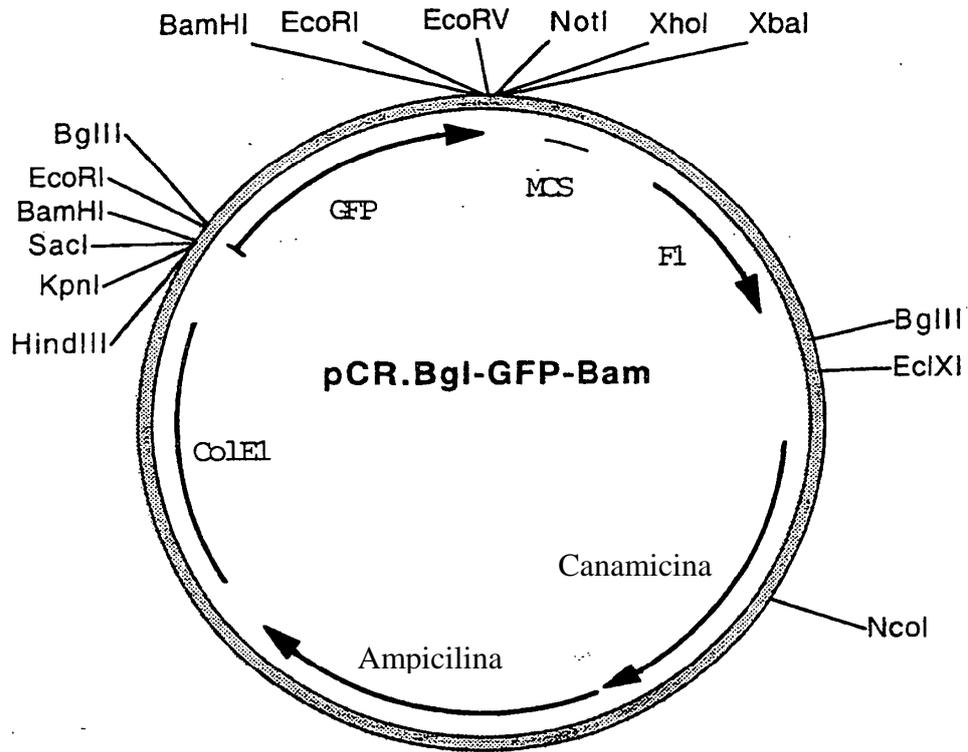
FIGURA 2



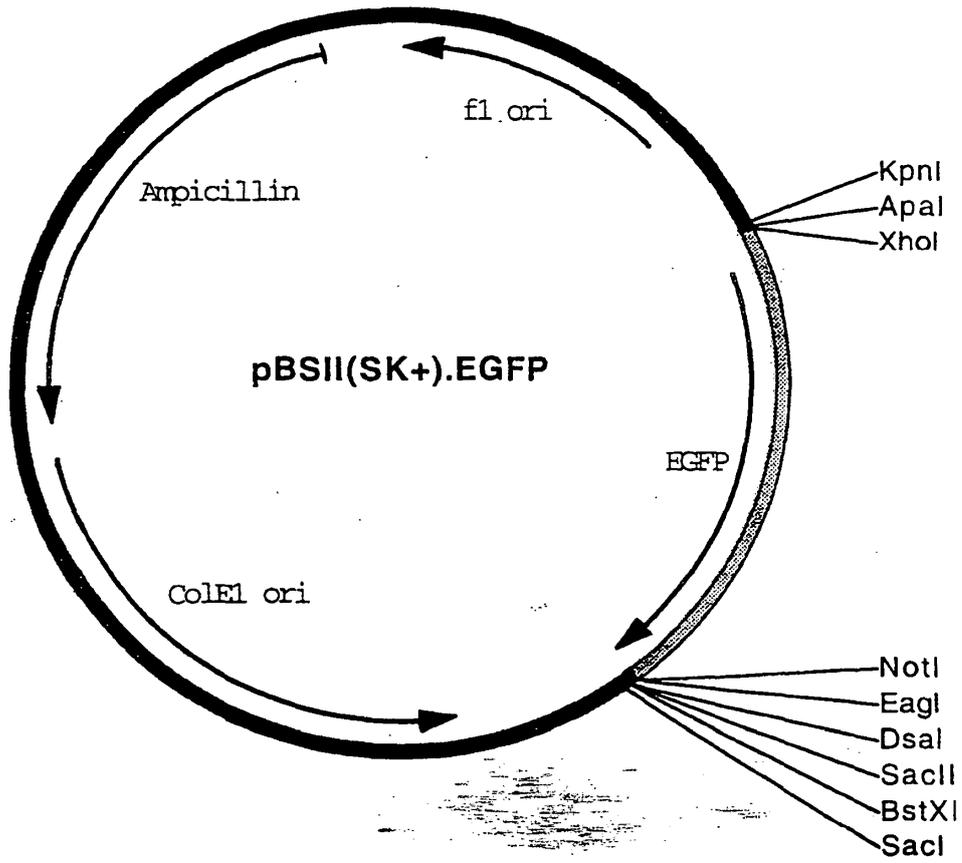
**FIGURA 3**



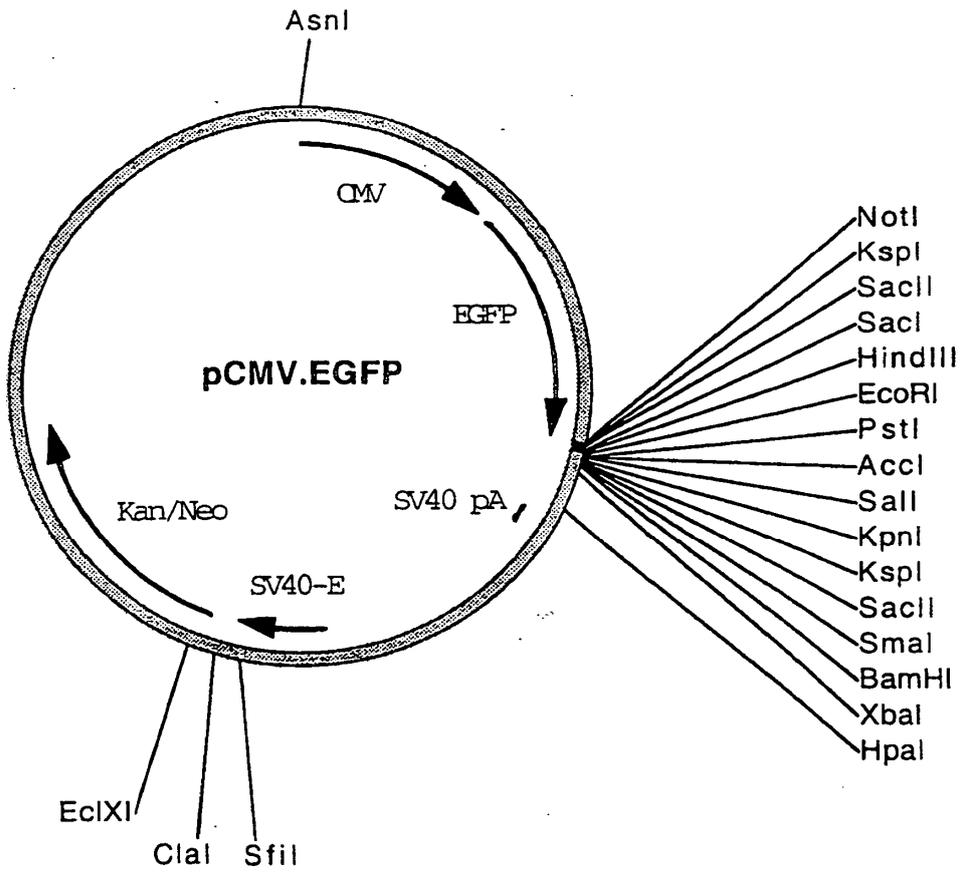
**FIGURA 4**



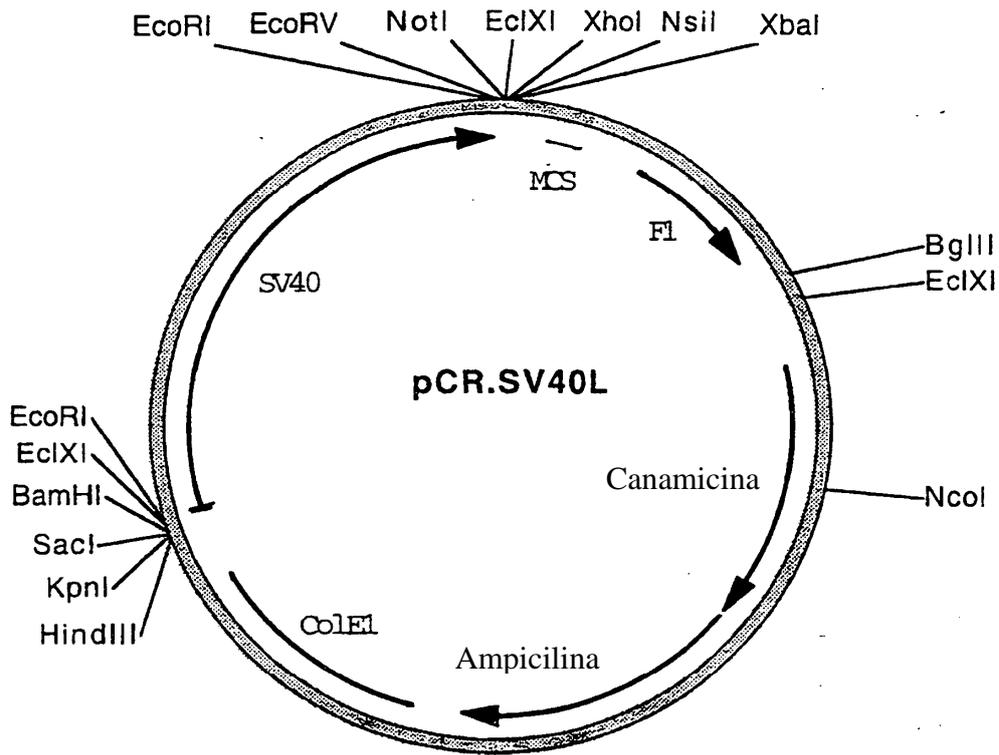
**FIGURA 5**



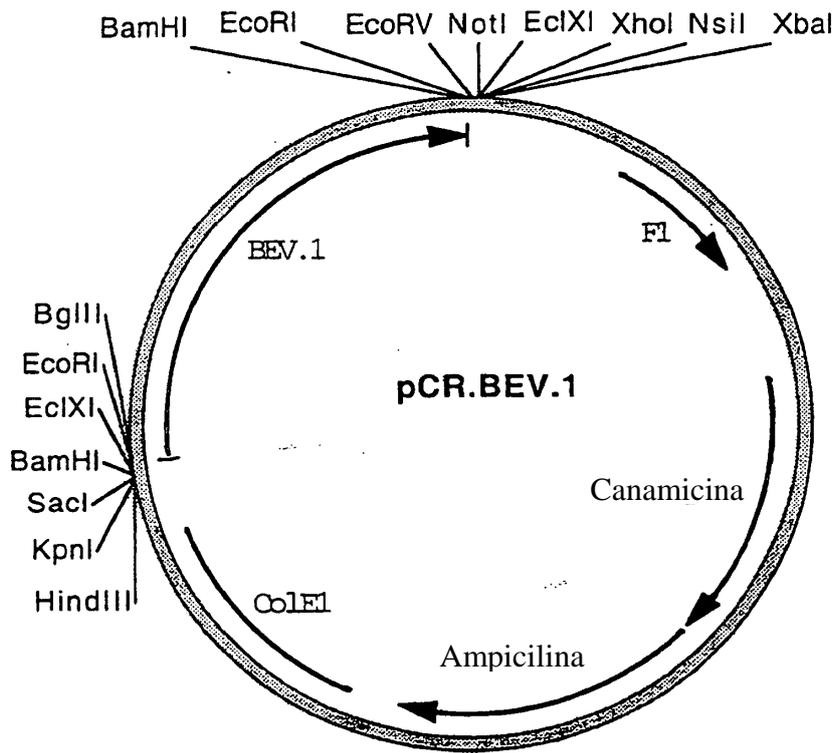
**FIGURA 6**



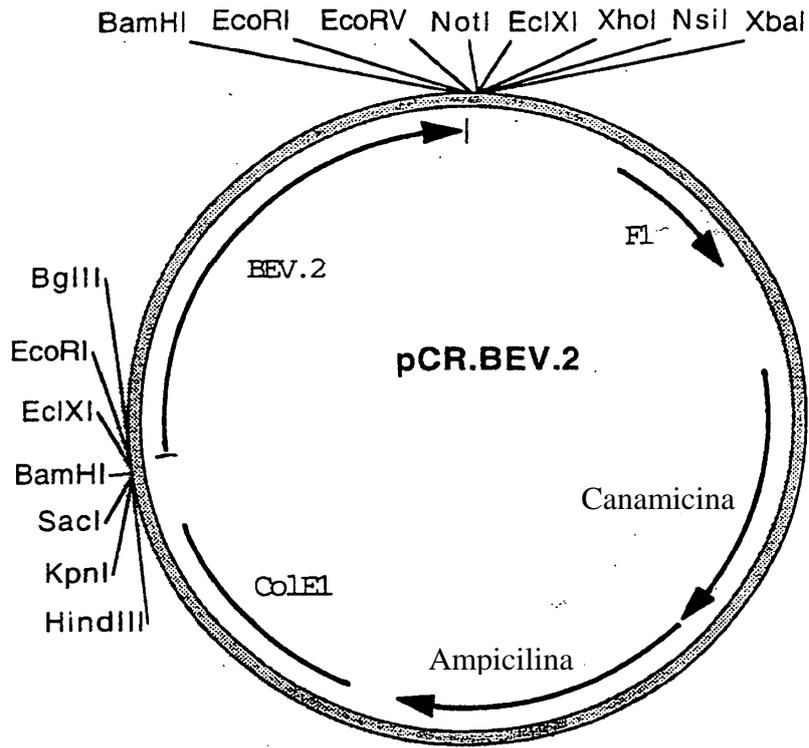
**FIGURA 7**



**FIGURA 8**



**FIGURA 9**



**FIGURA 10**

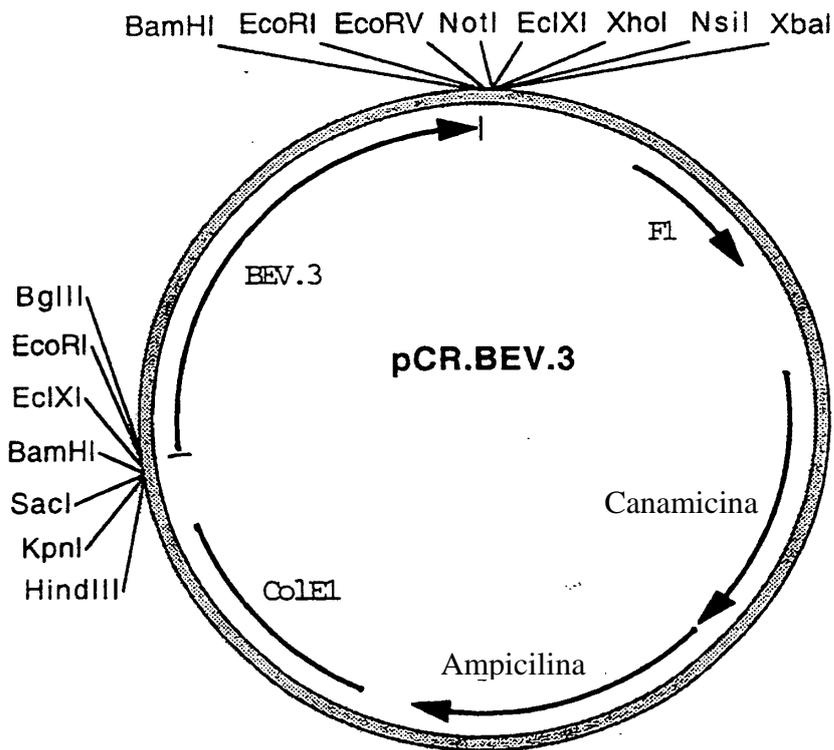


FIGURA 11

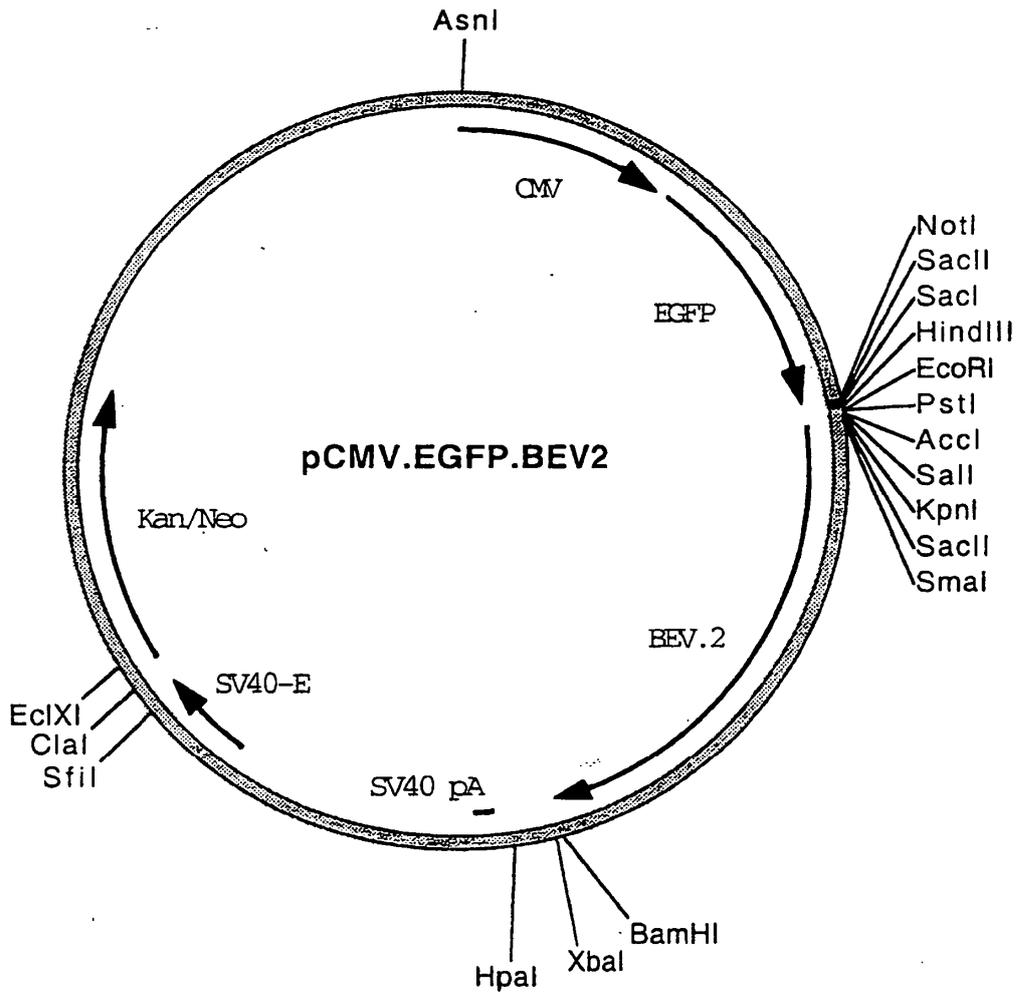
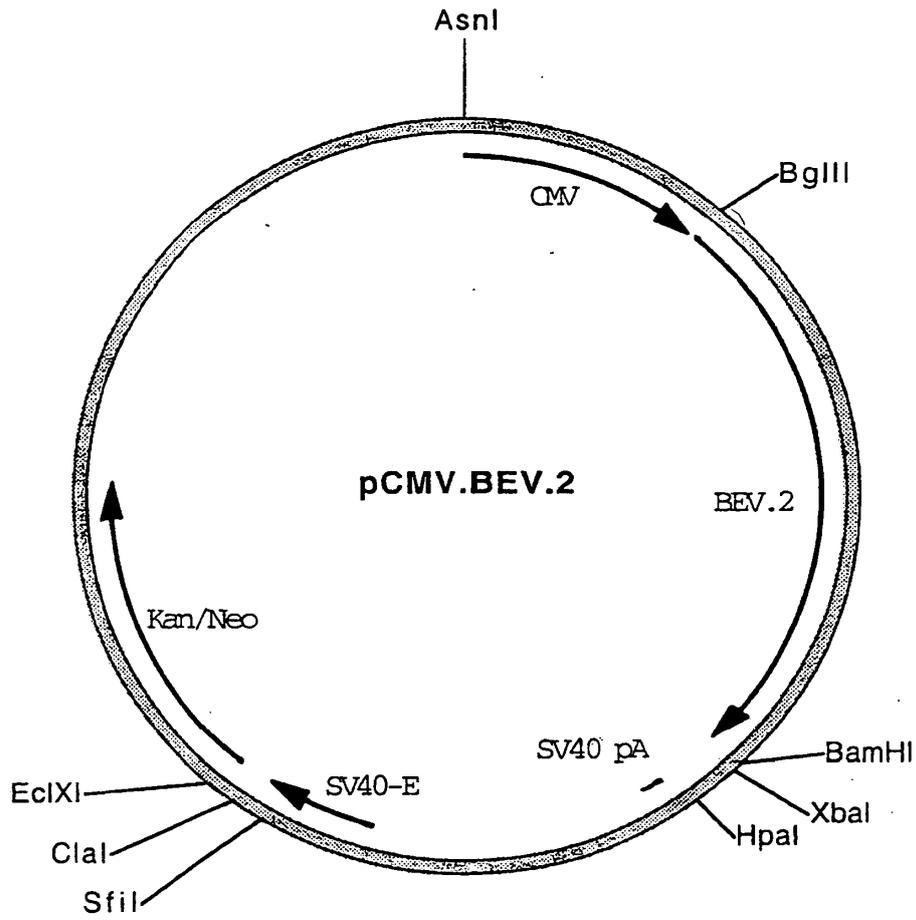
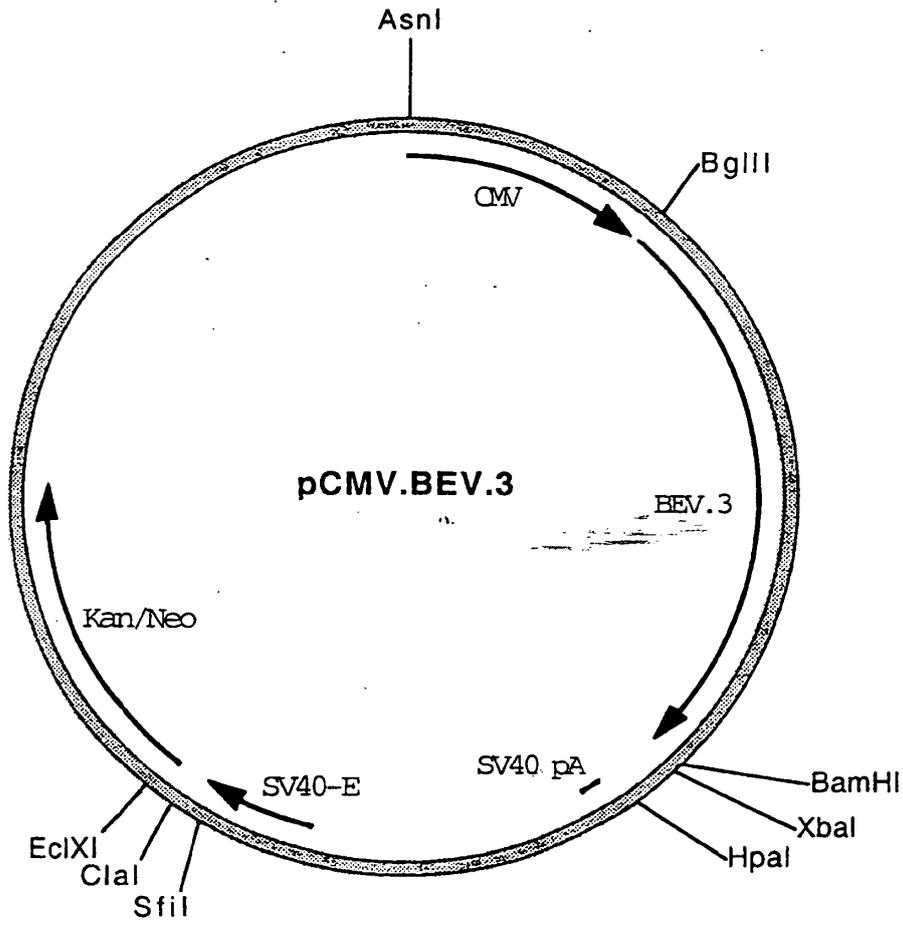


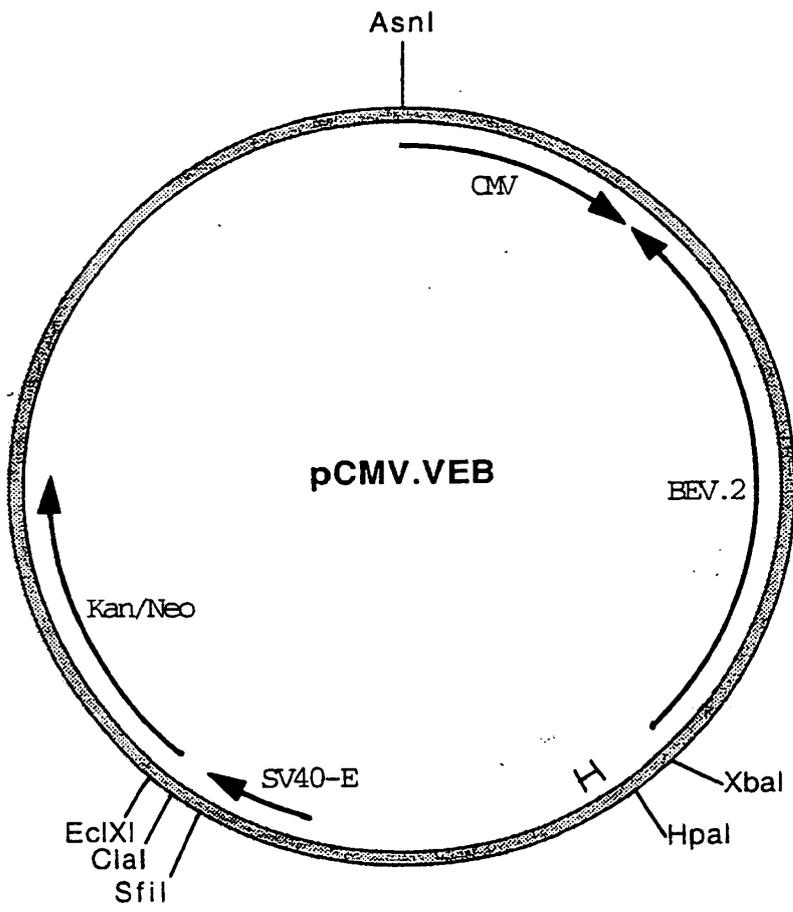
FIGURA 12



**FIGURA 13**



**FIGURA 14**



**FIGURA 15**

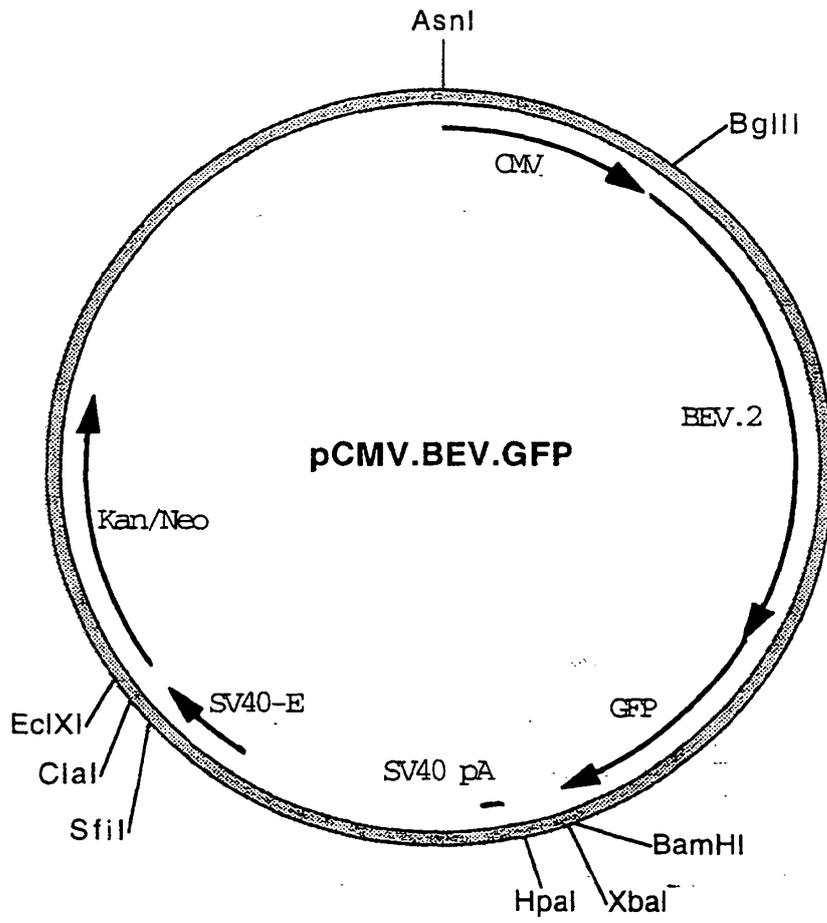
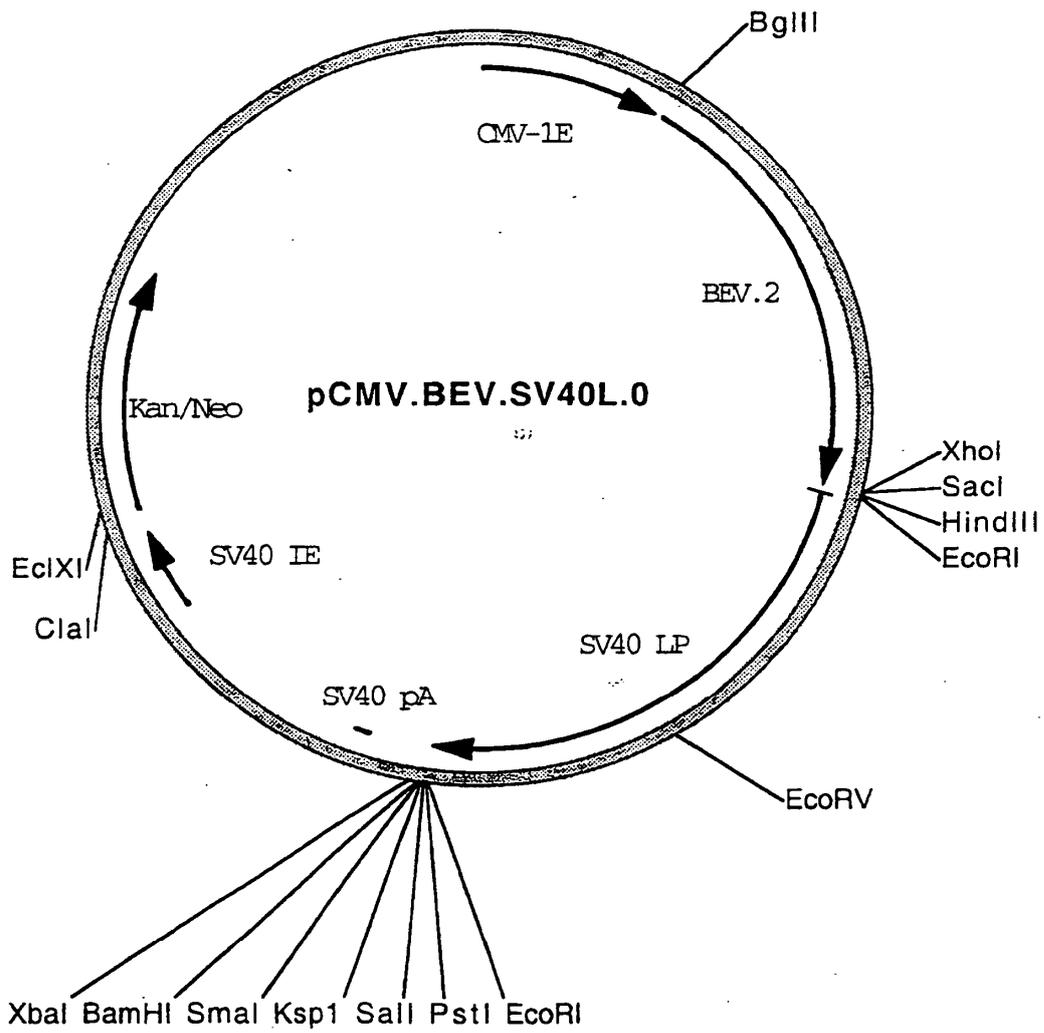


FIGURA 16



**FIGURA 17**

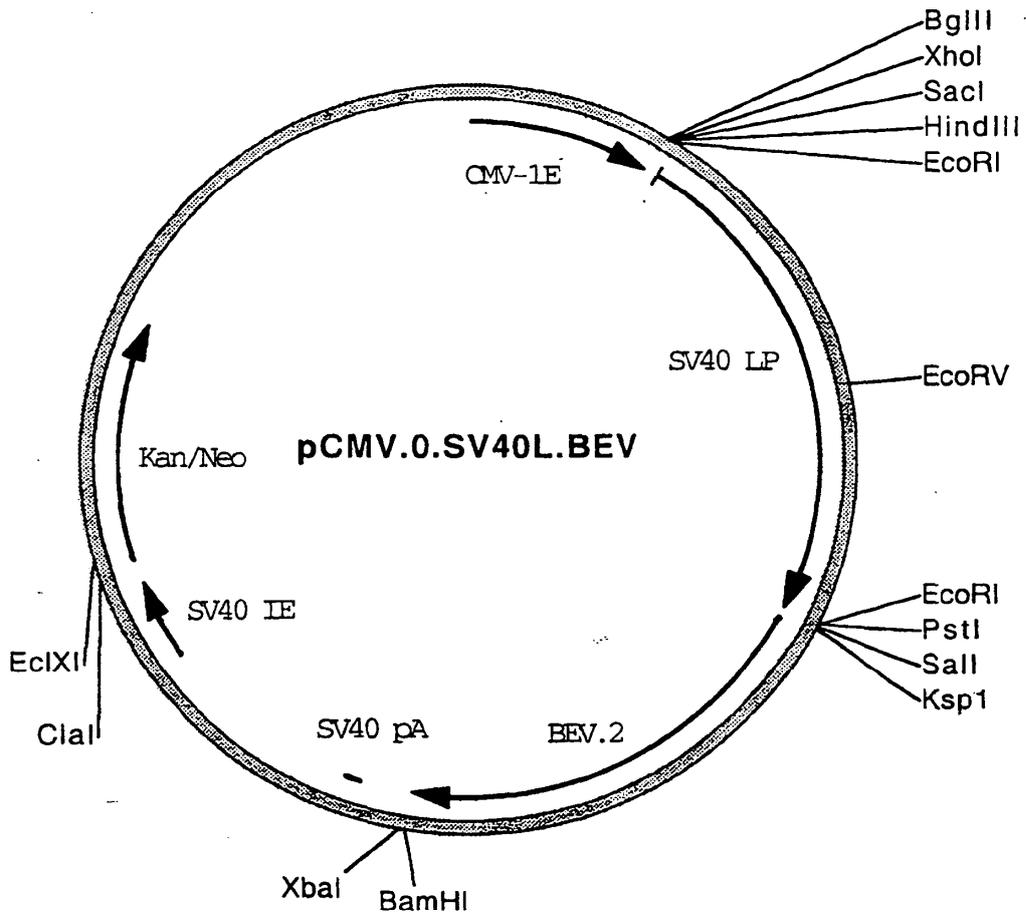


FIGURA 18

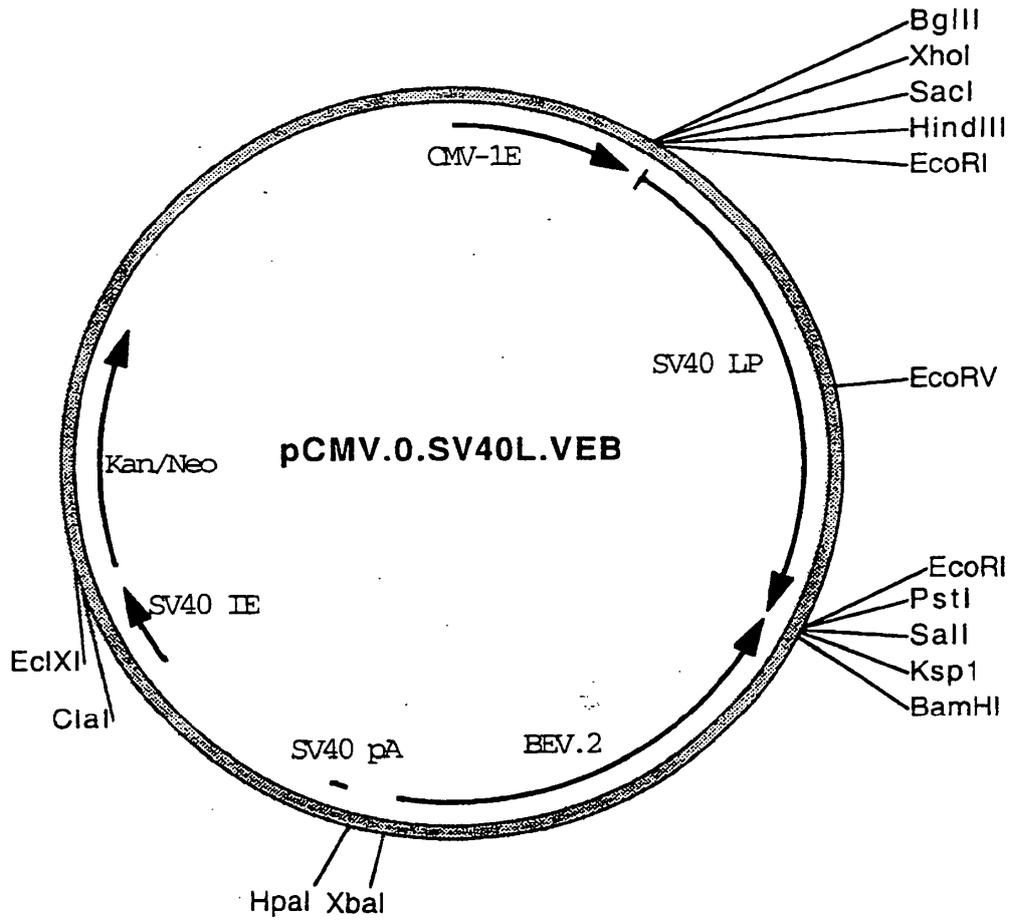


FIGURA 19

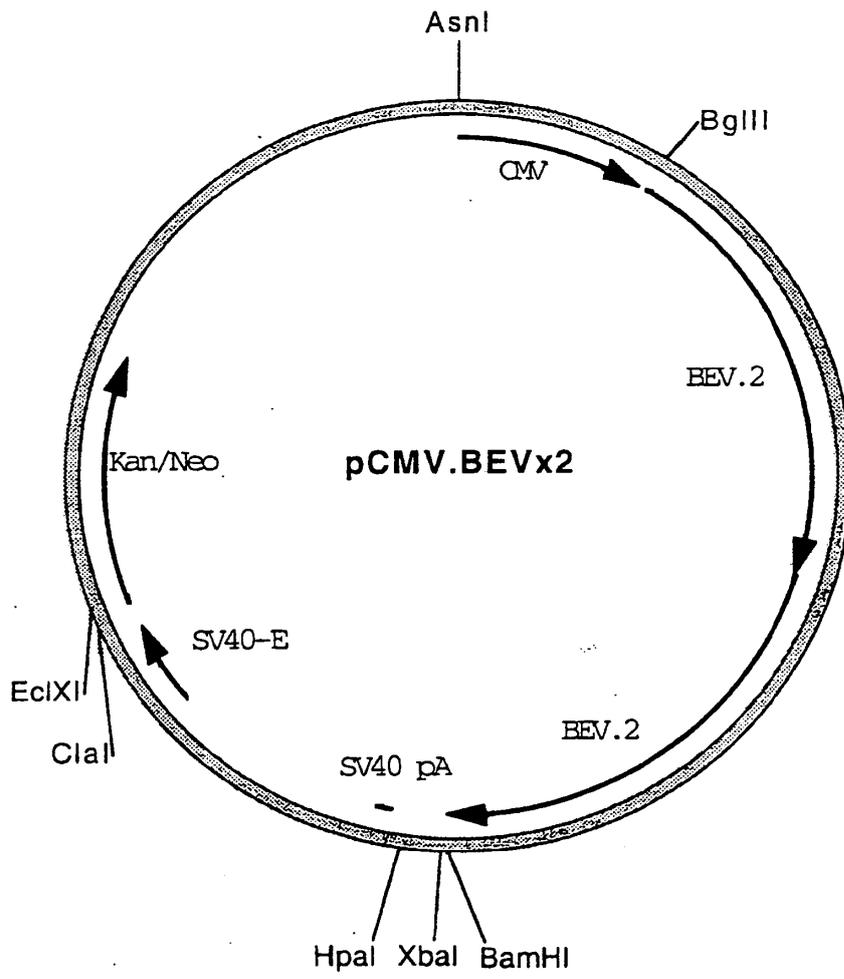


FIGURA 20

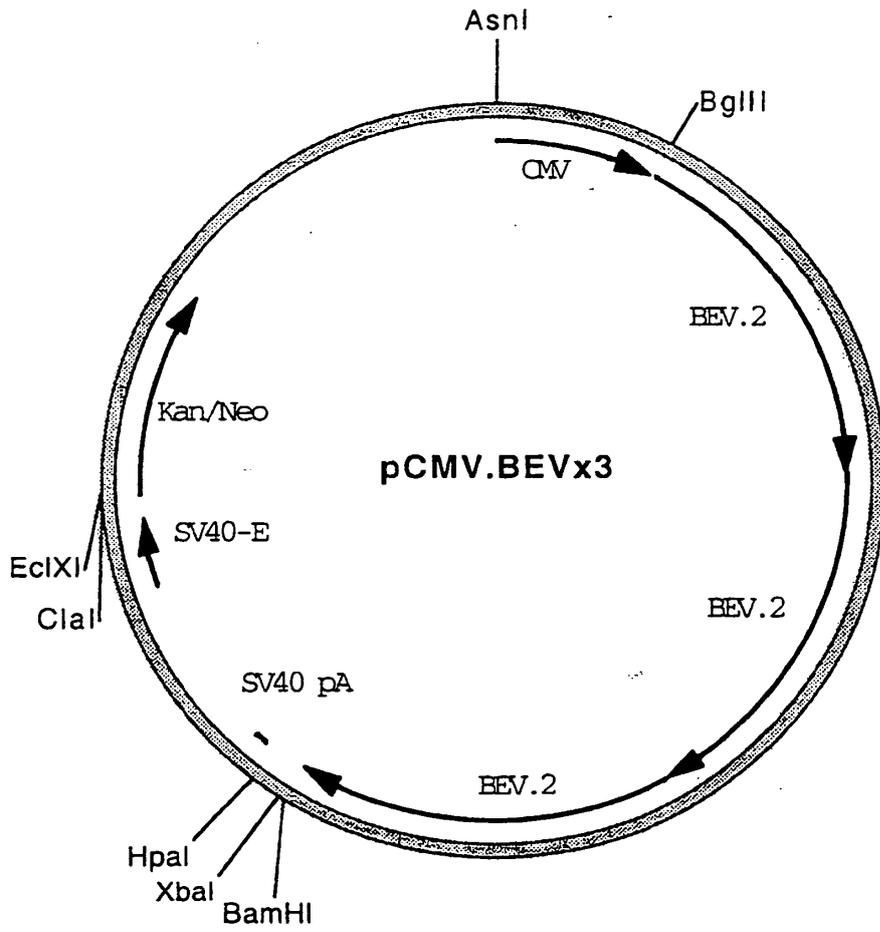
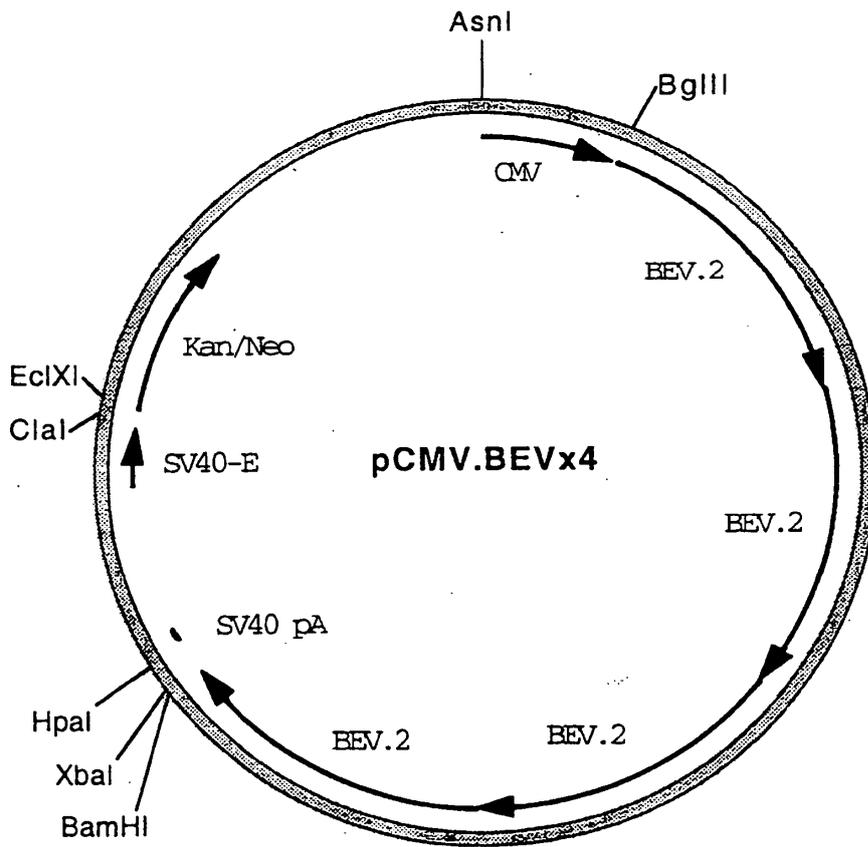


FIGURA 21



**FIGURA 22**

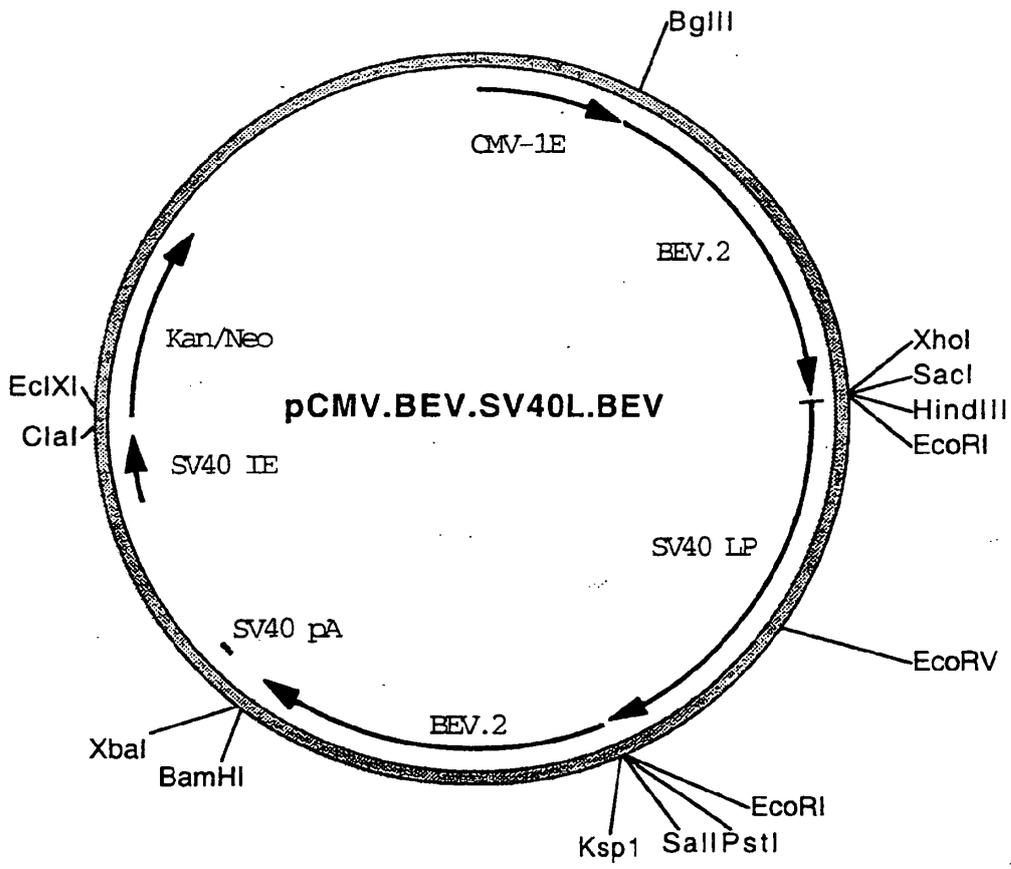
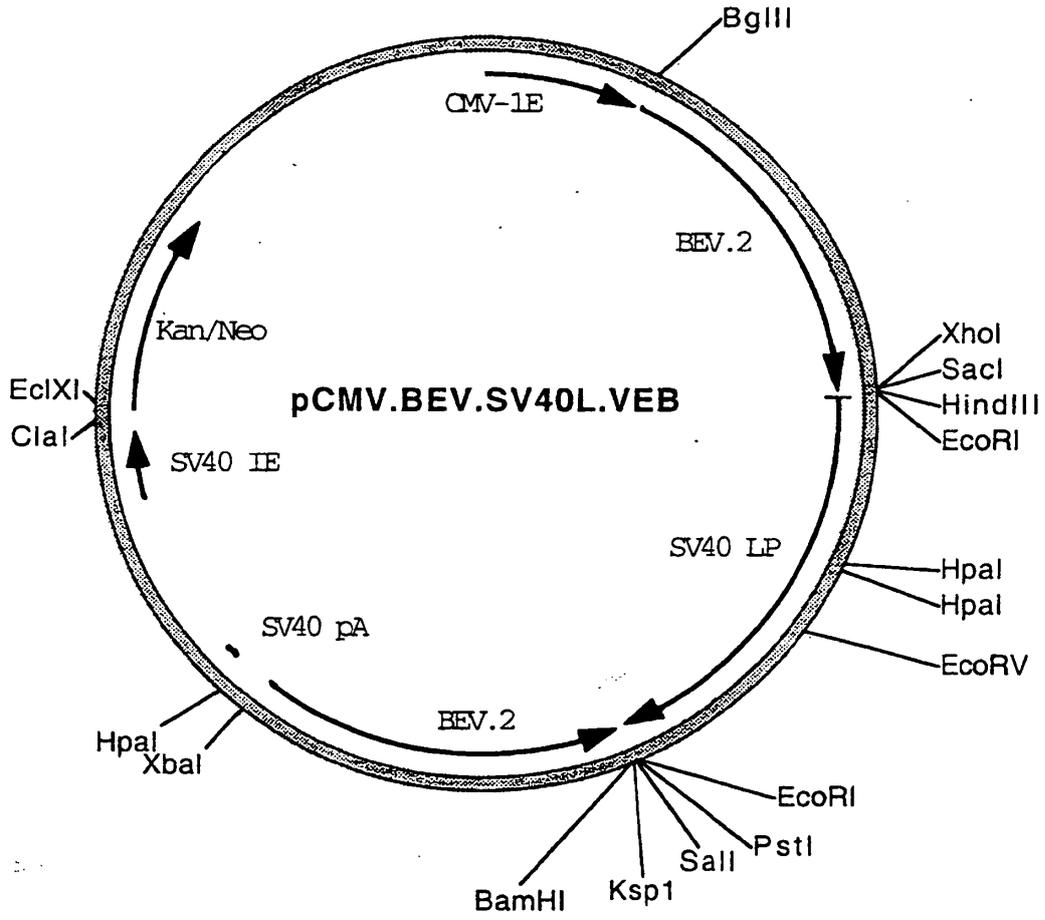


FIGURA 23



**FIGURA 24**

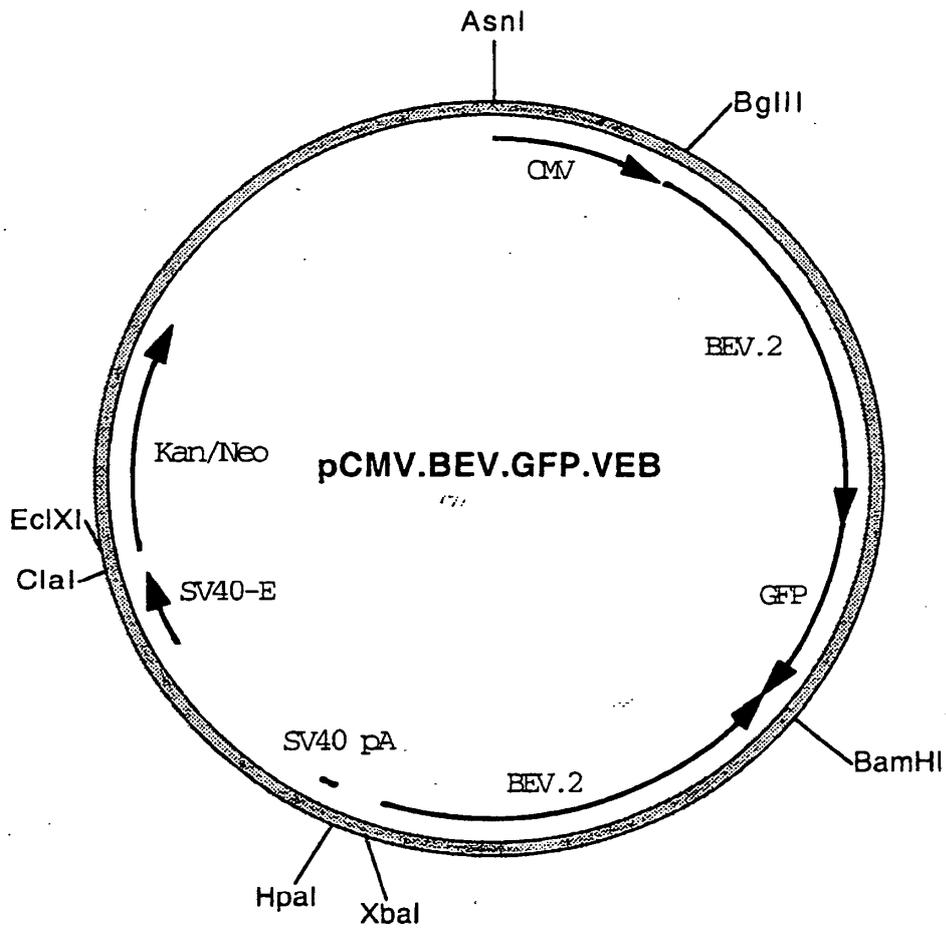


FIGURA 25

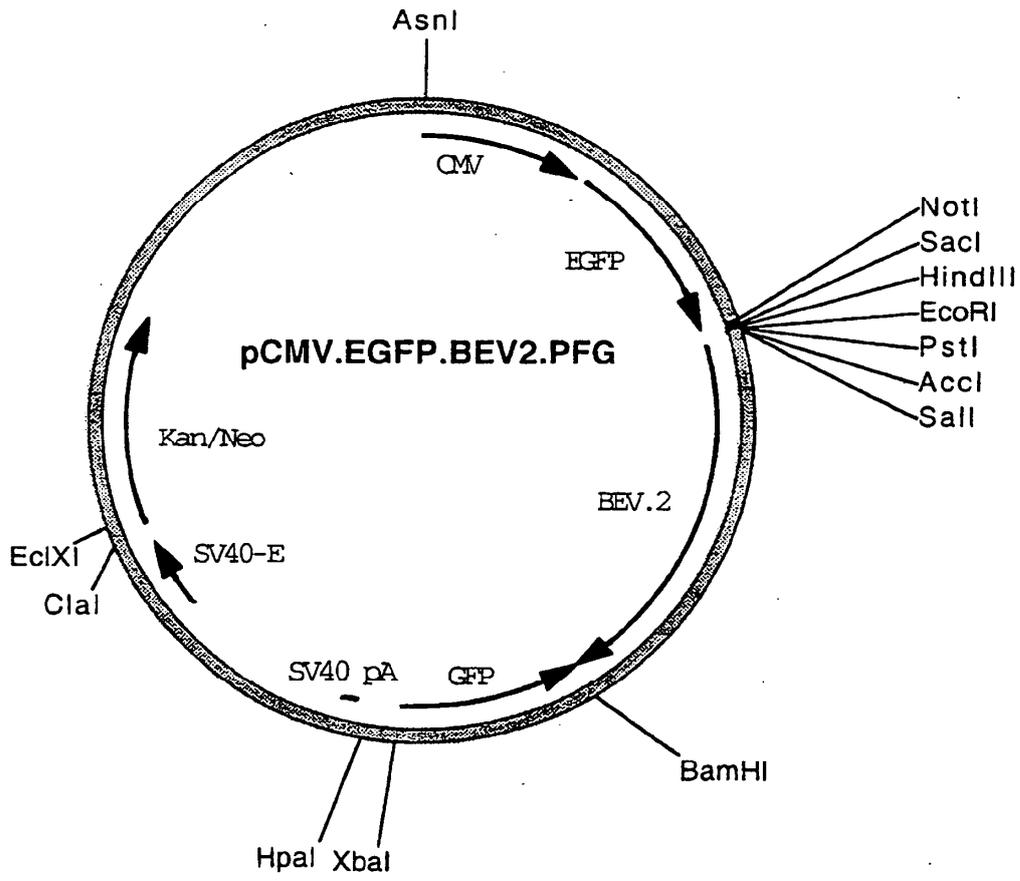


FIGURA 26

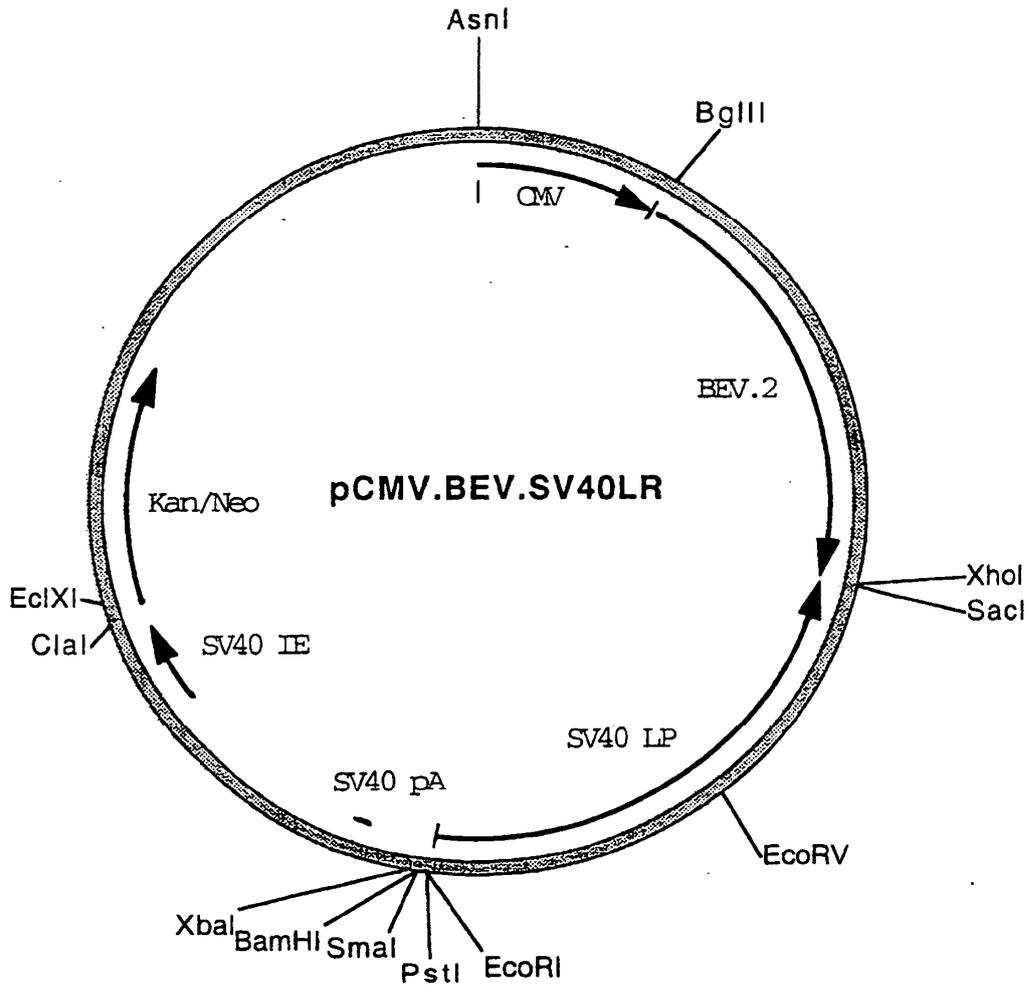


FIGURA 27

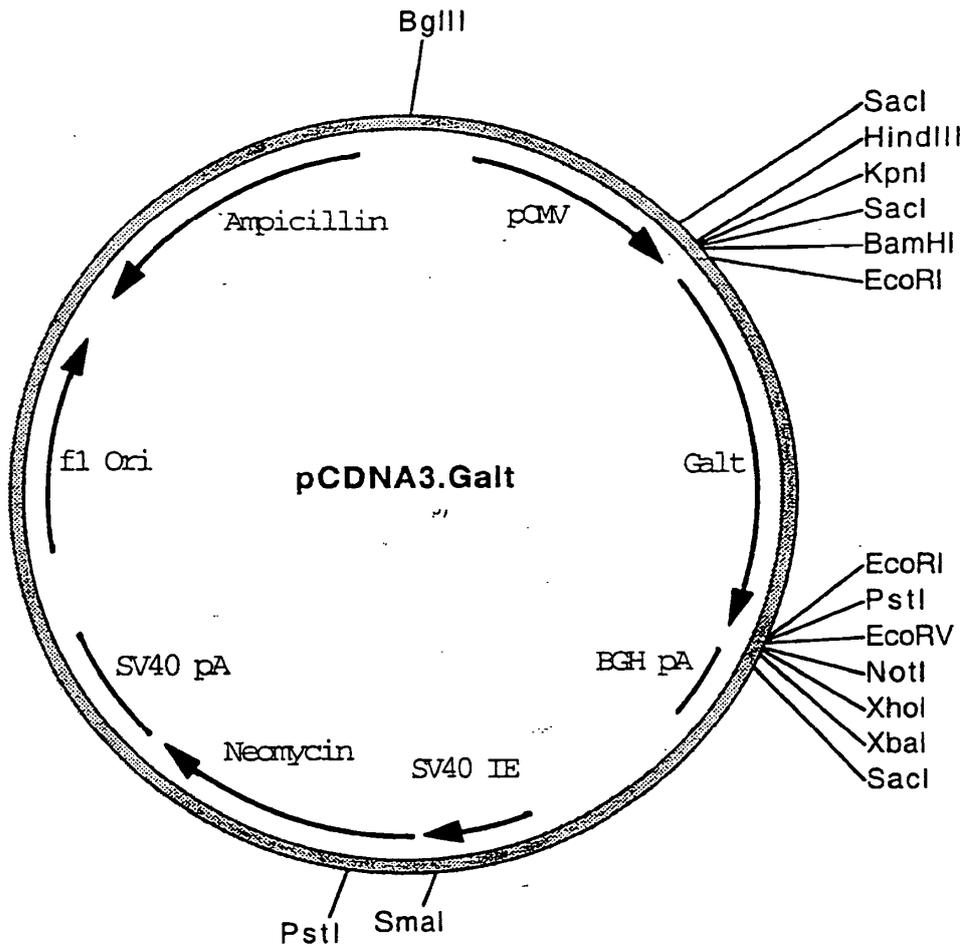


FIGURA 28

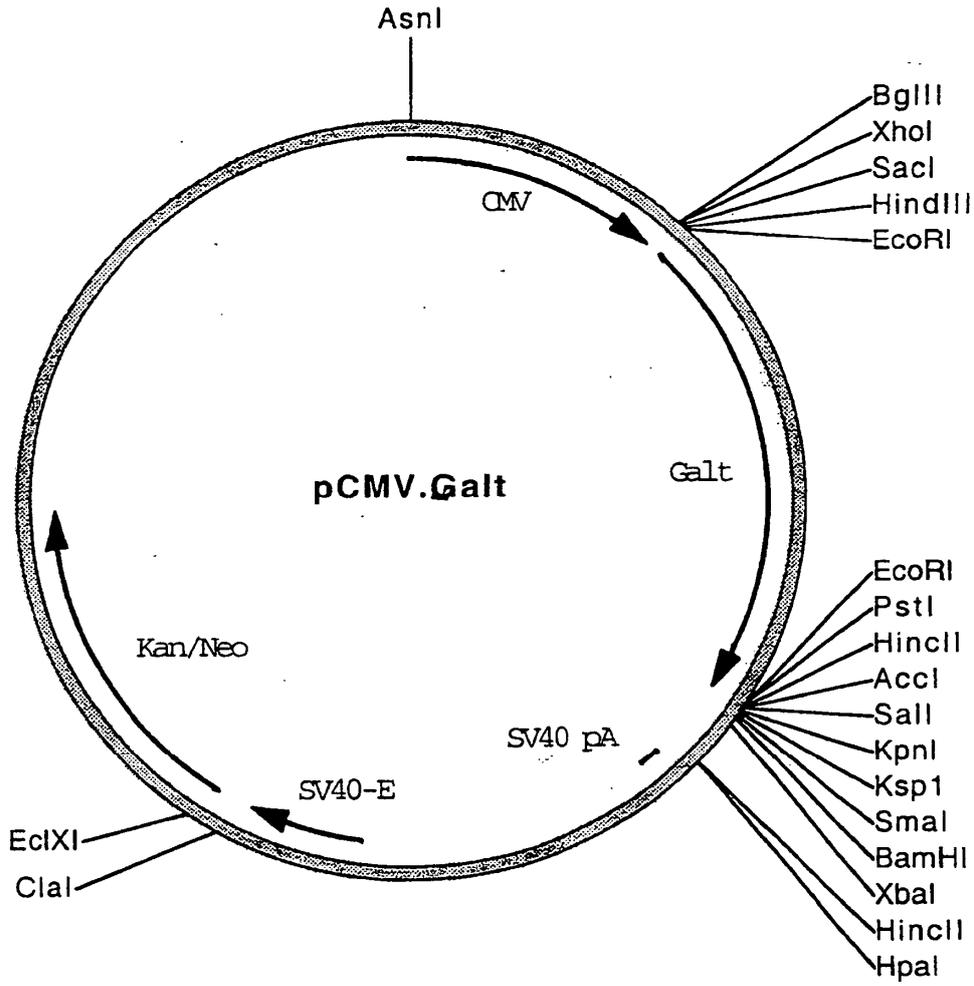
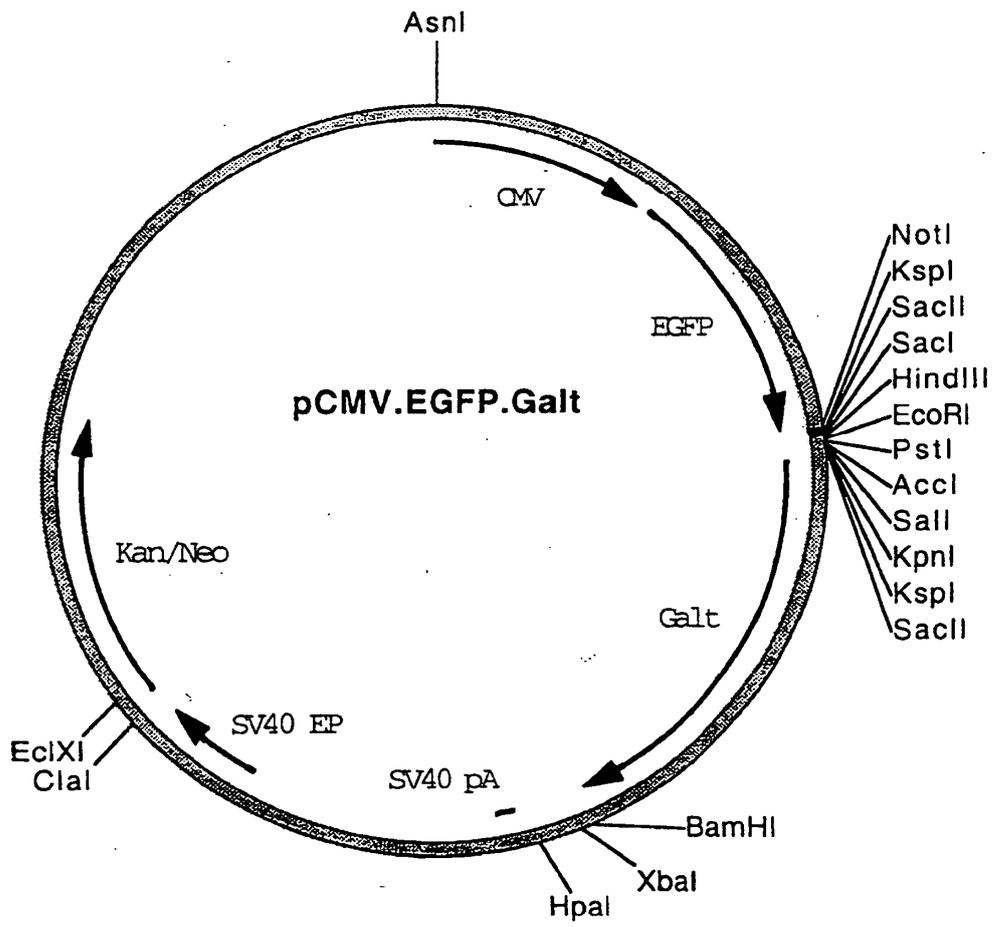


FIGURA 29



**FIGURA 30**

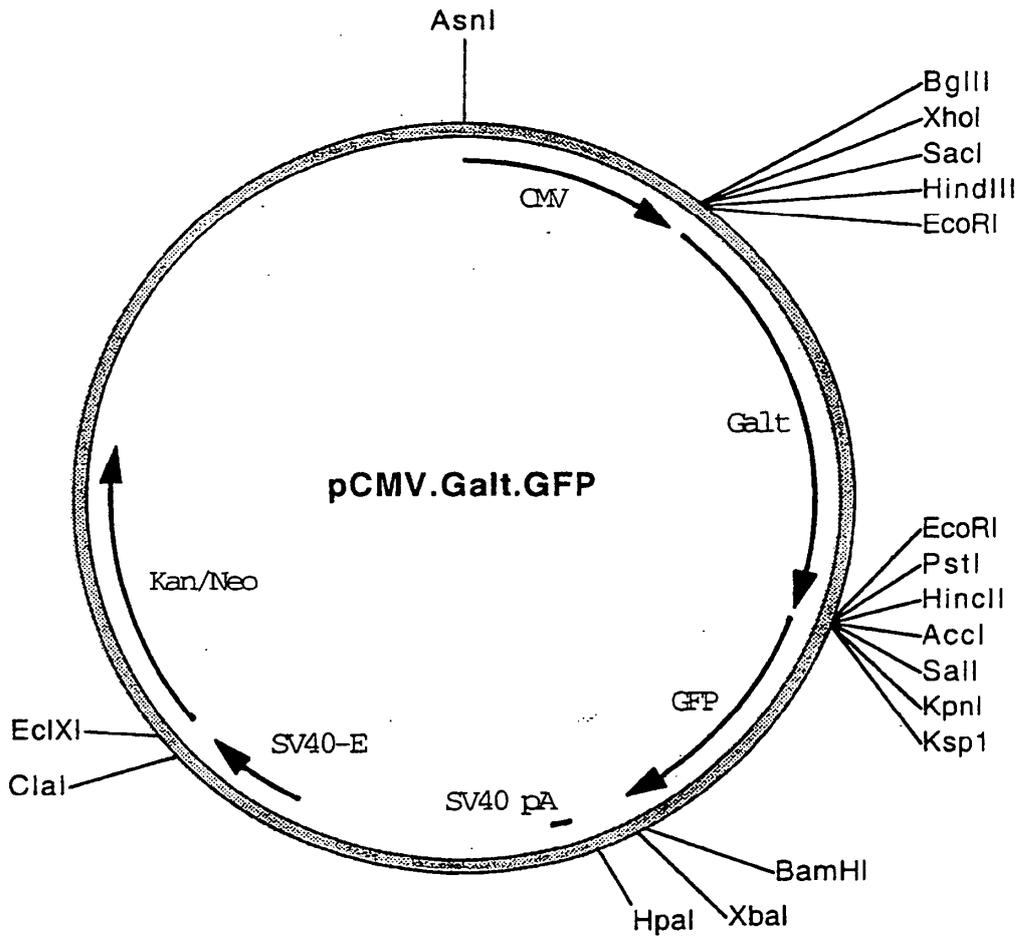
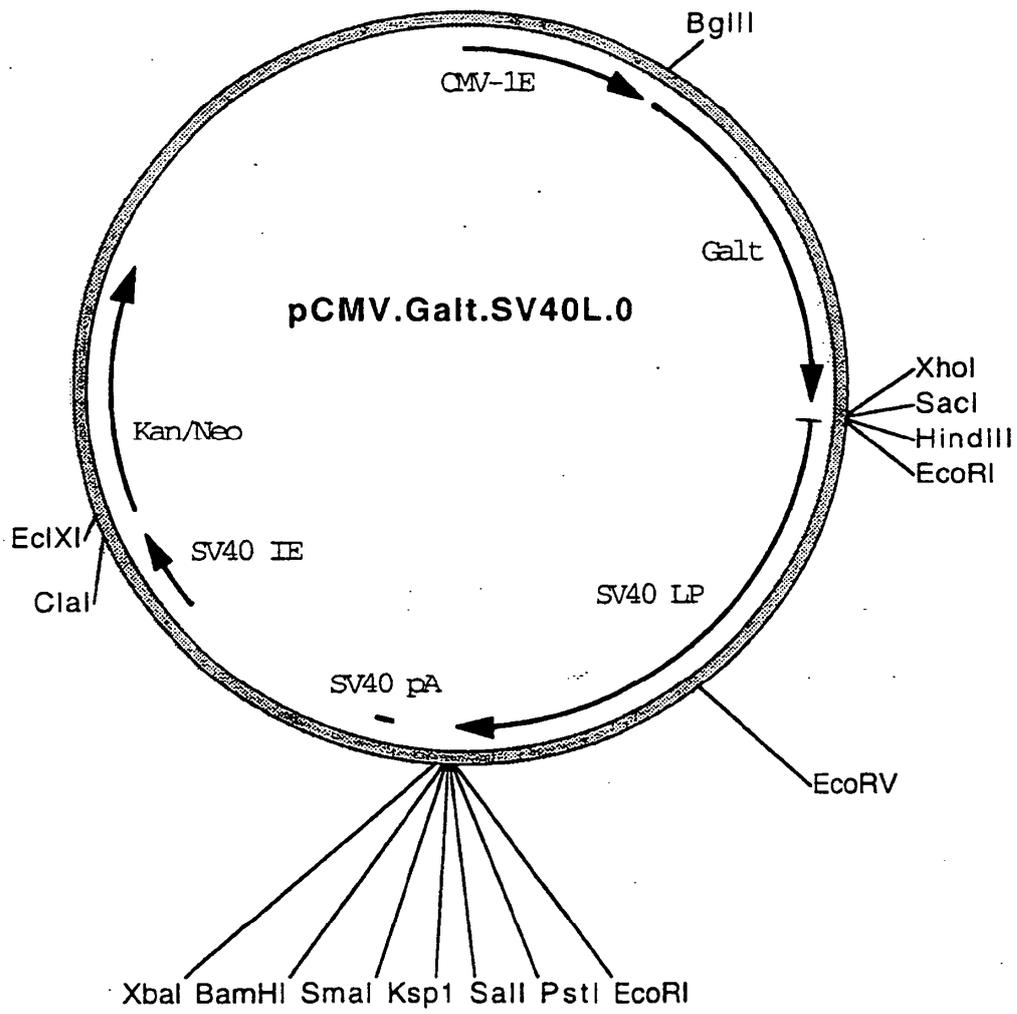


FIGURA 31



**FIGURA 32**

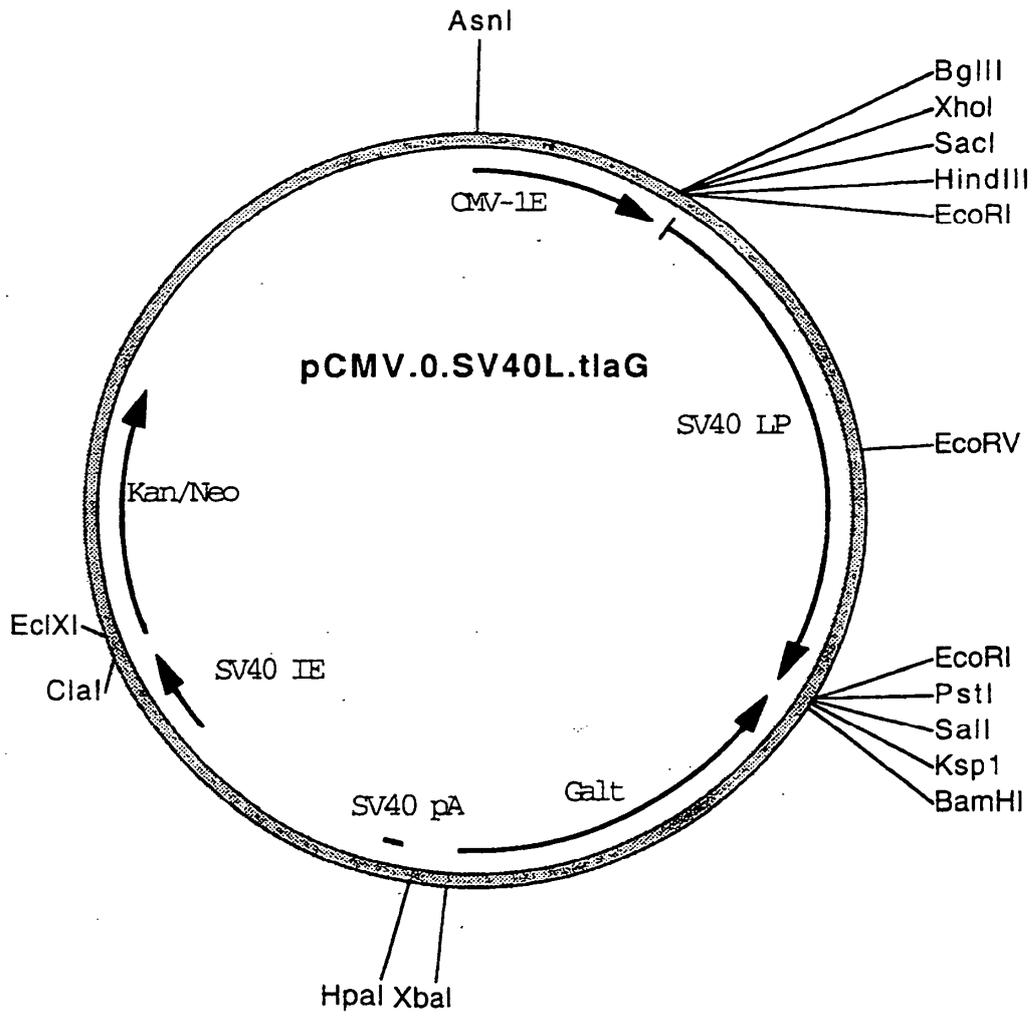
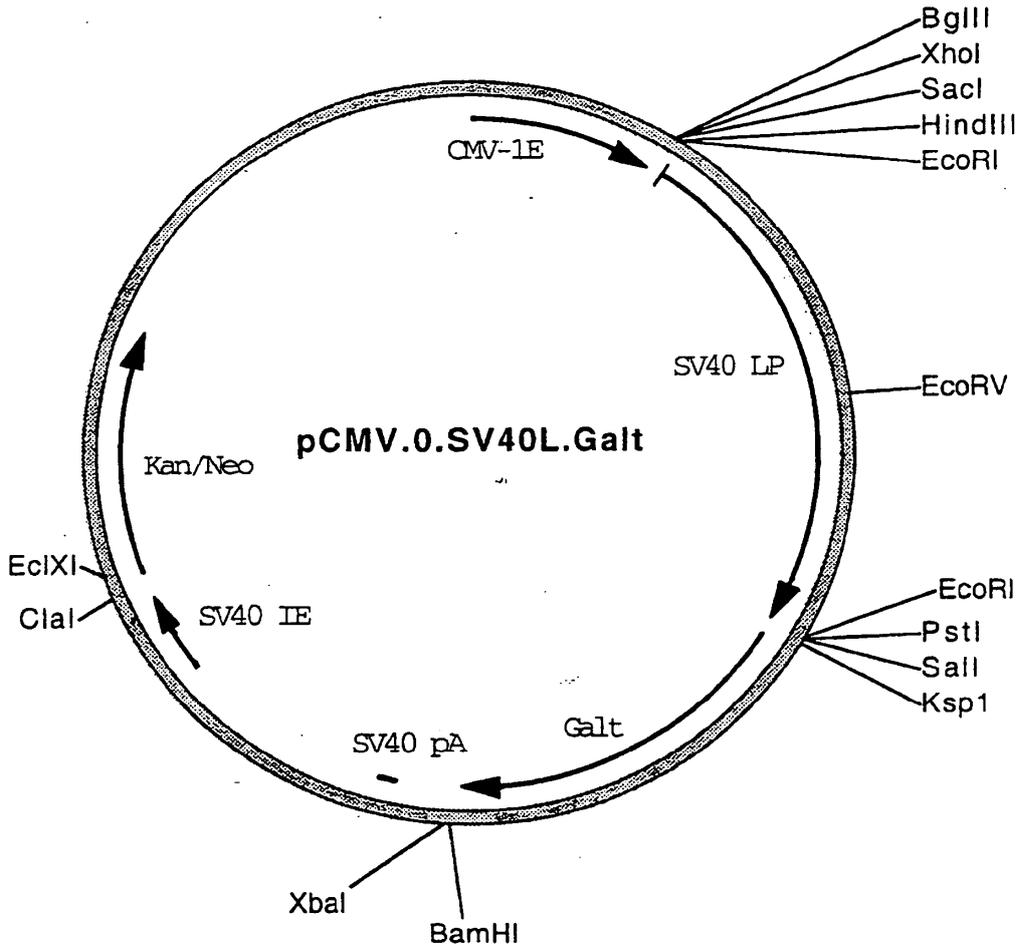
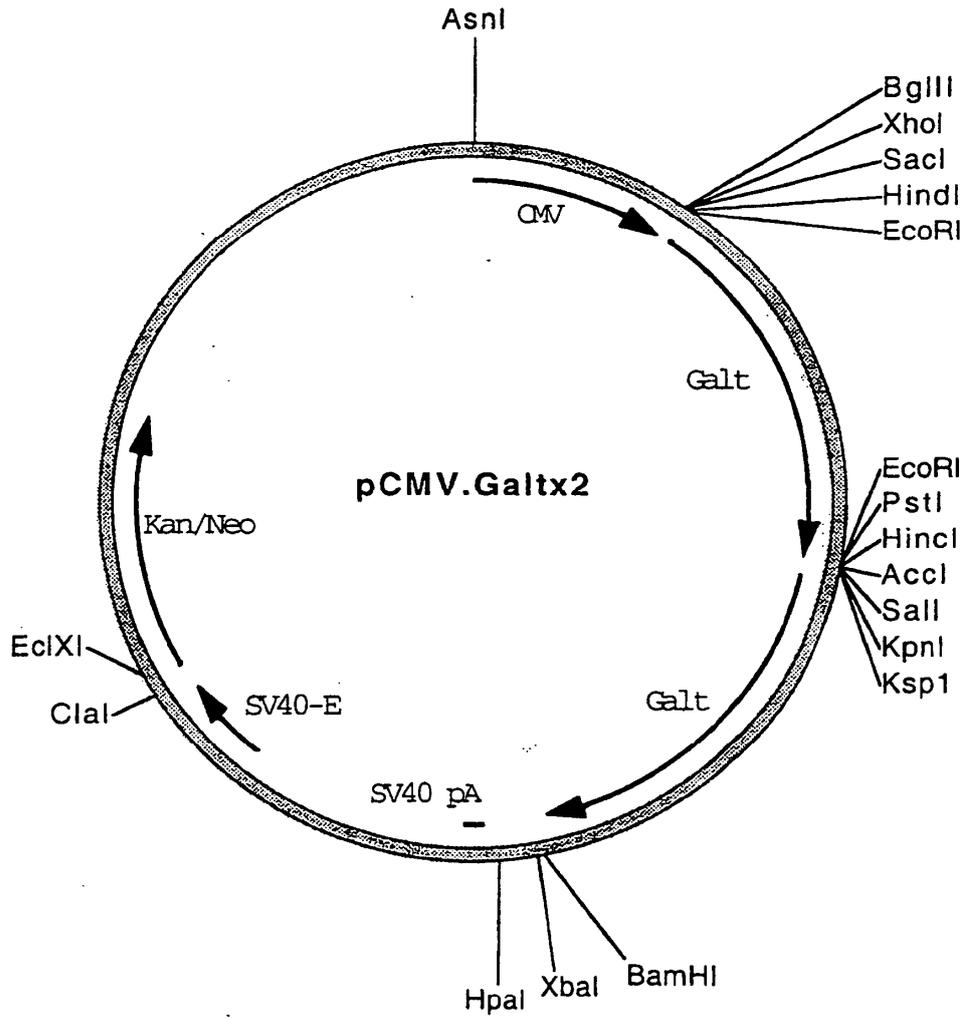


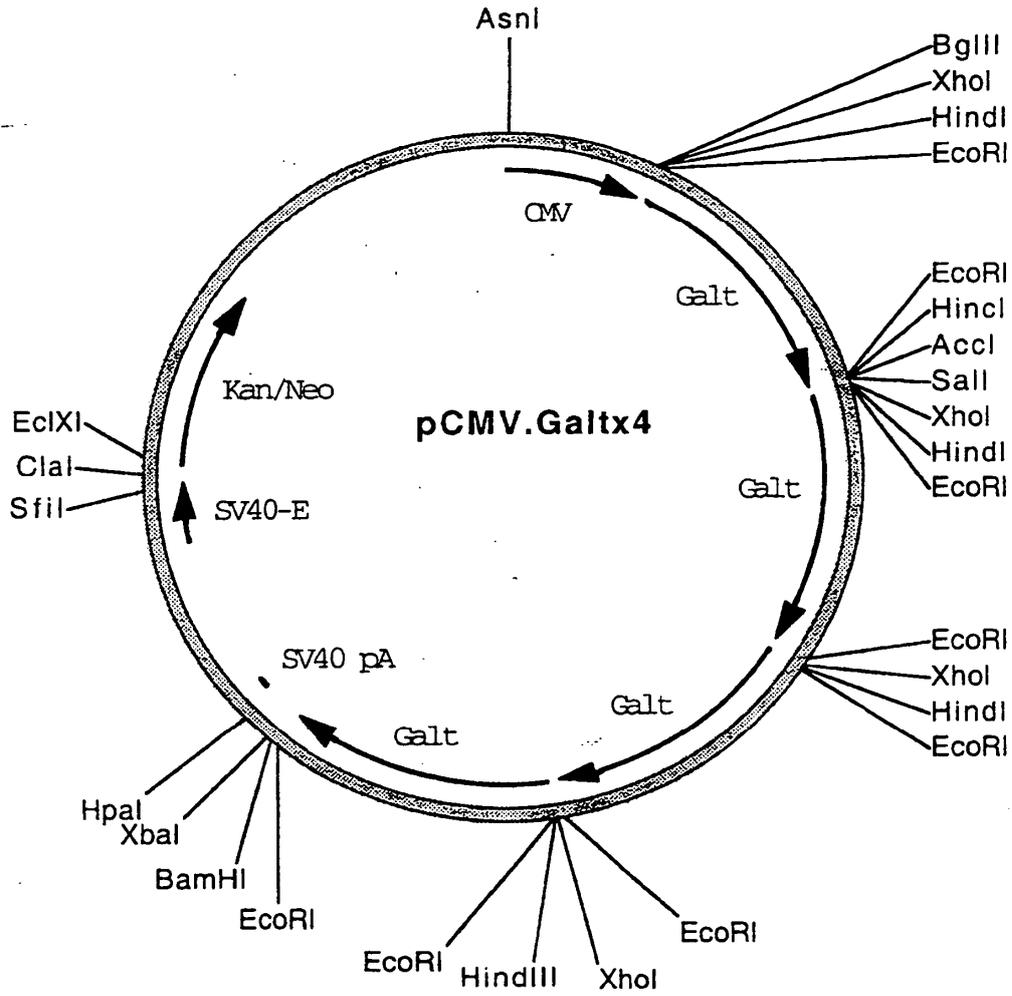
FIGURA 33



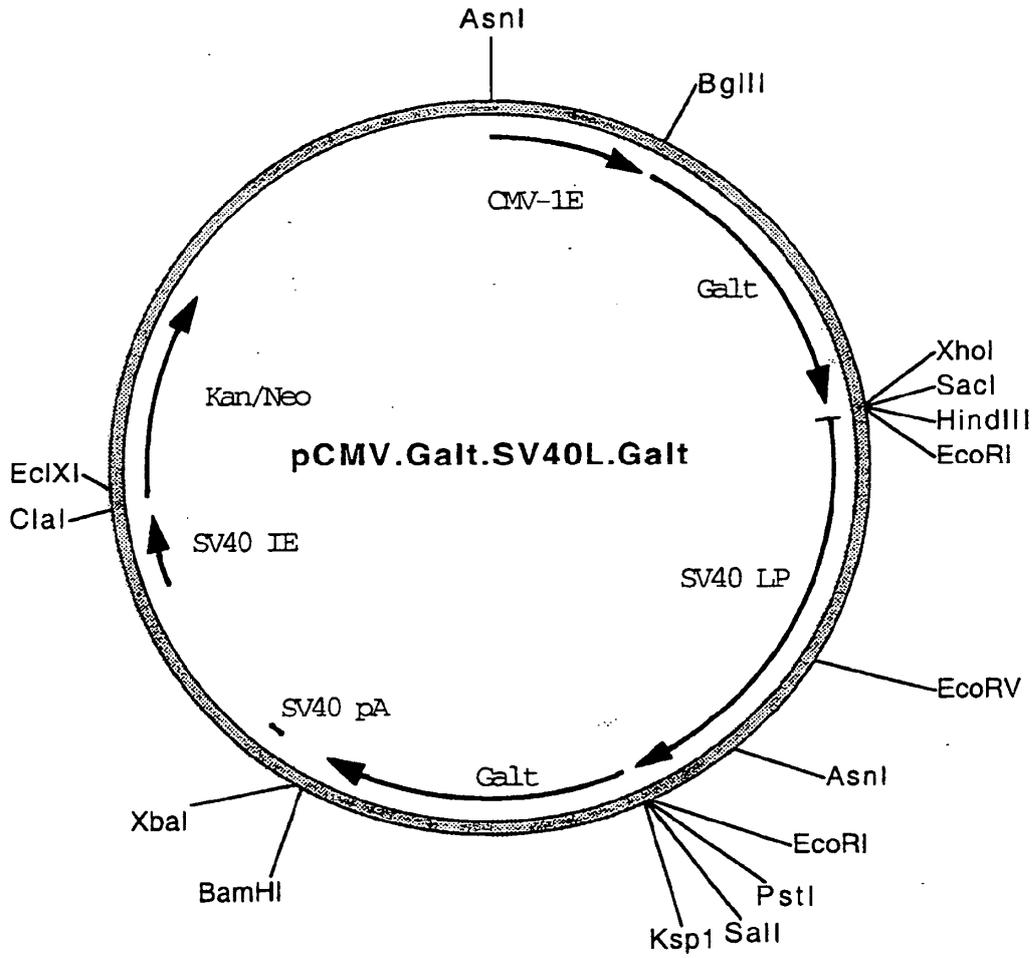
**FIGURA 34**



**FIGURA 35**



**FIGURA 36**



**FIGURA 37**

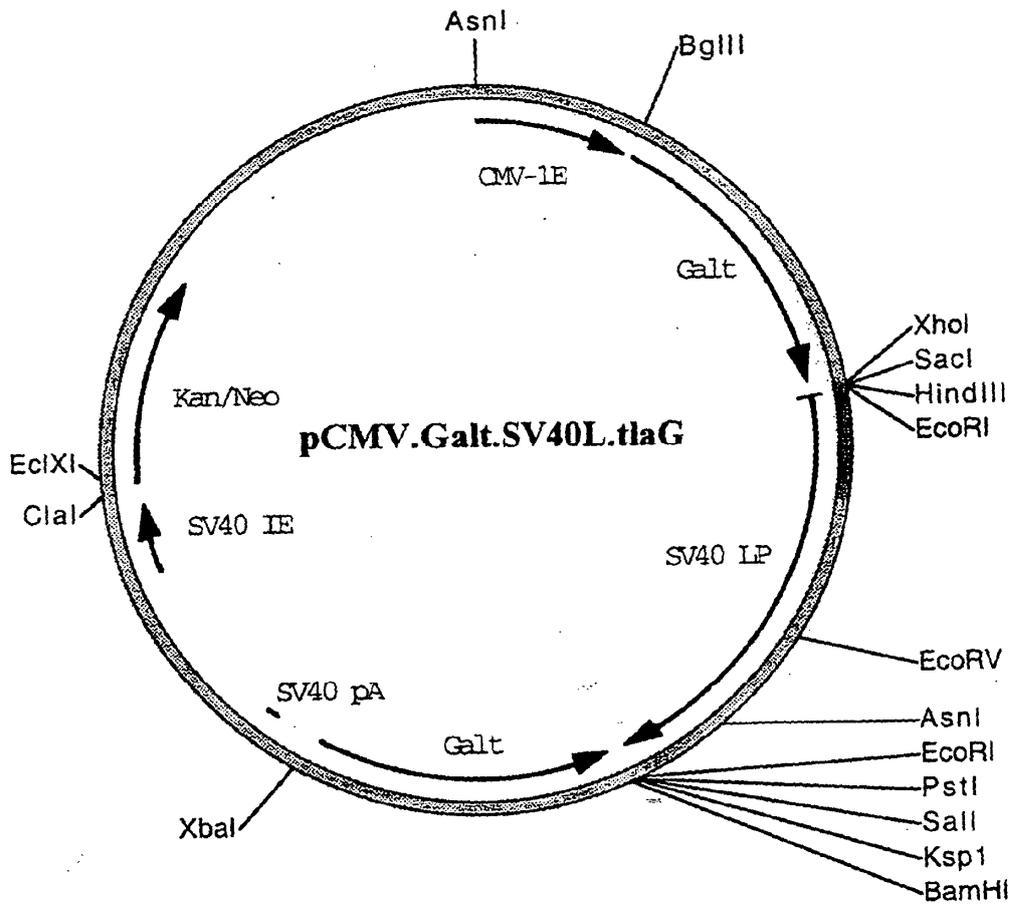
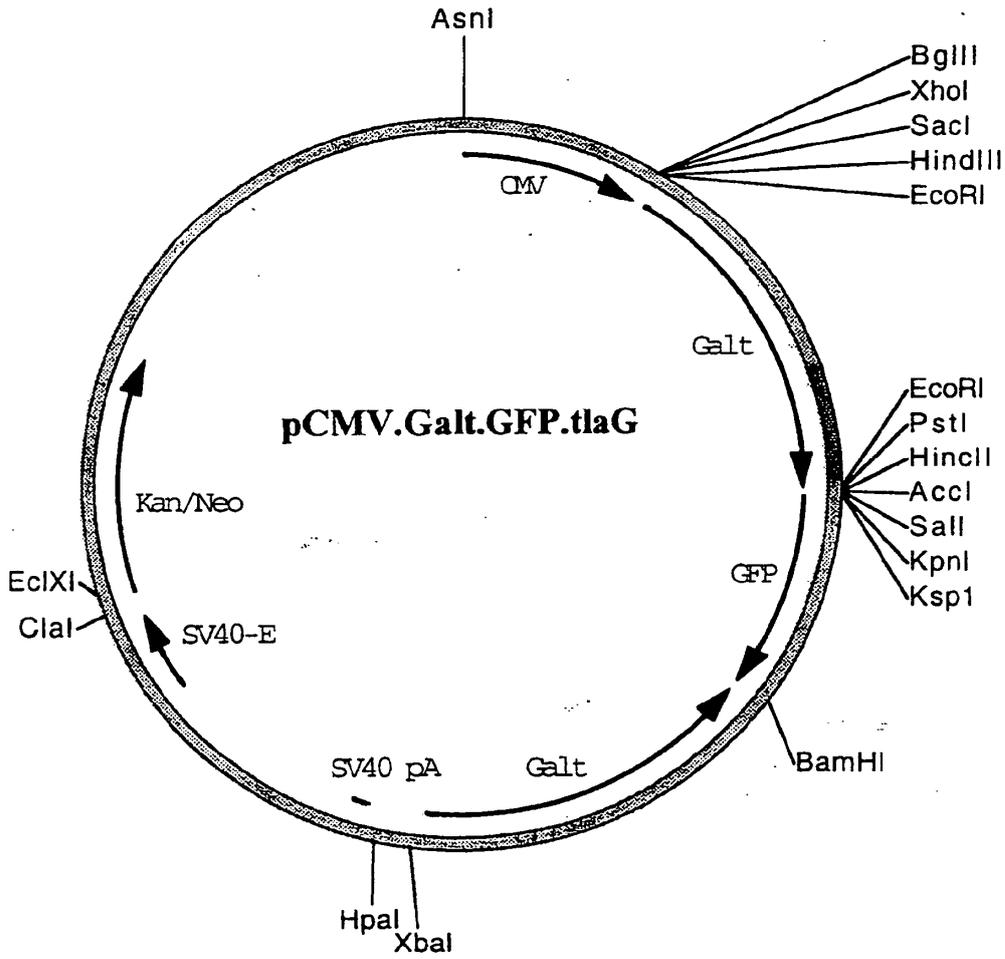
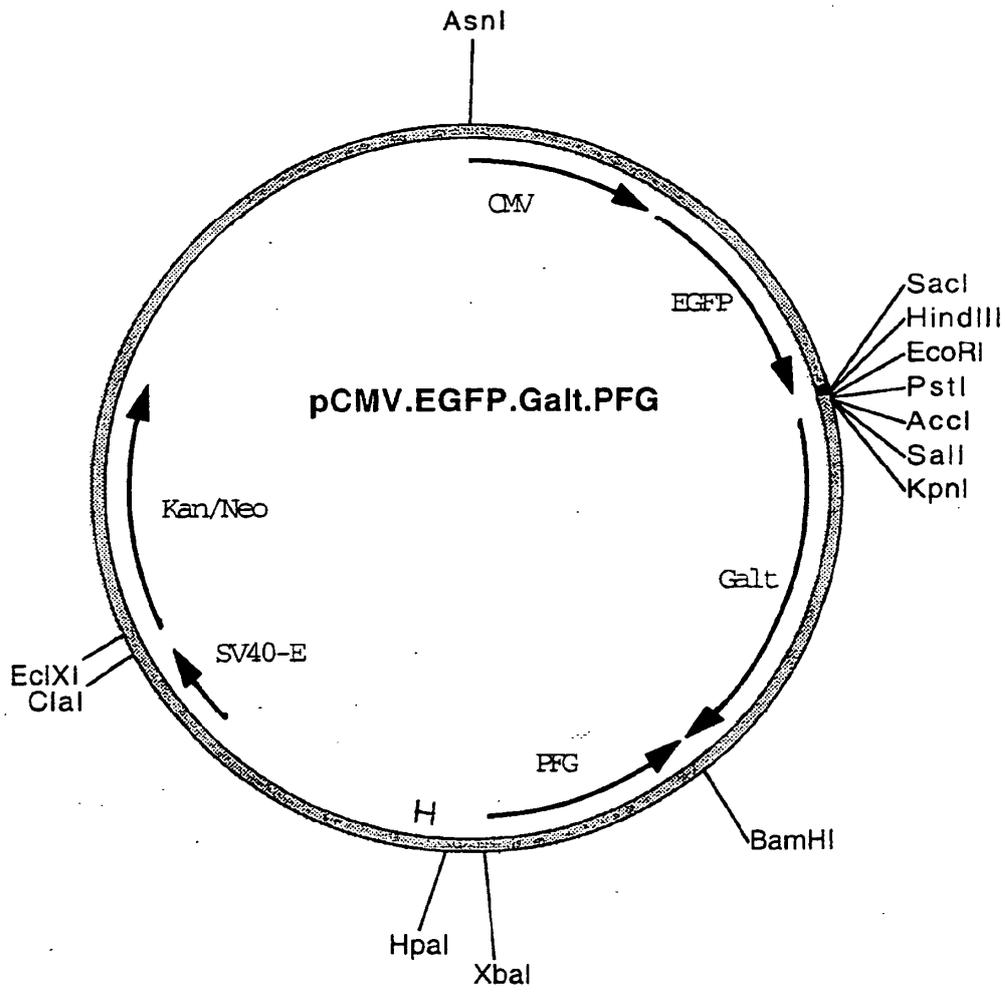


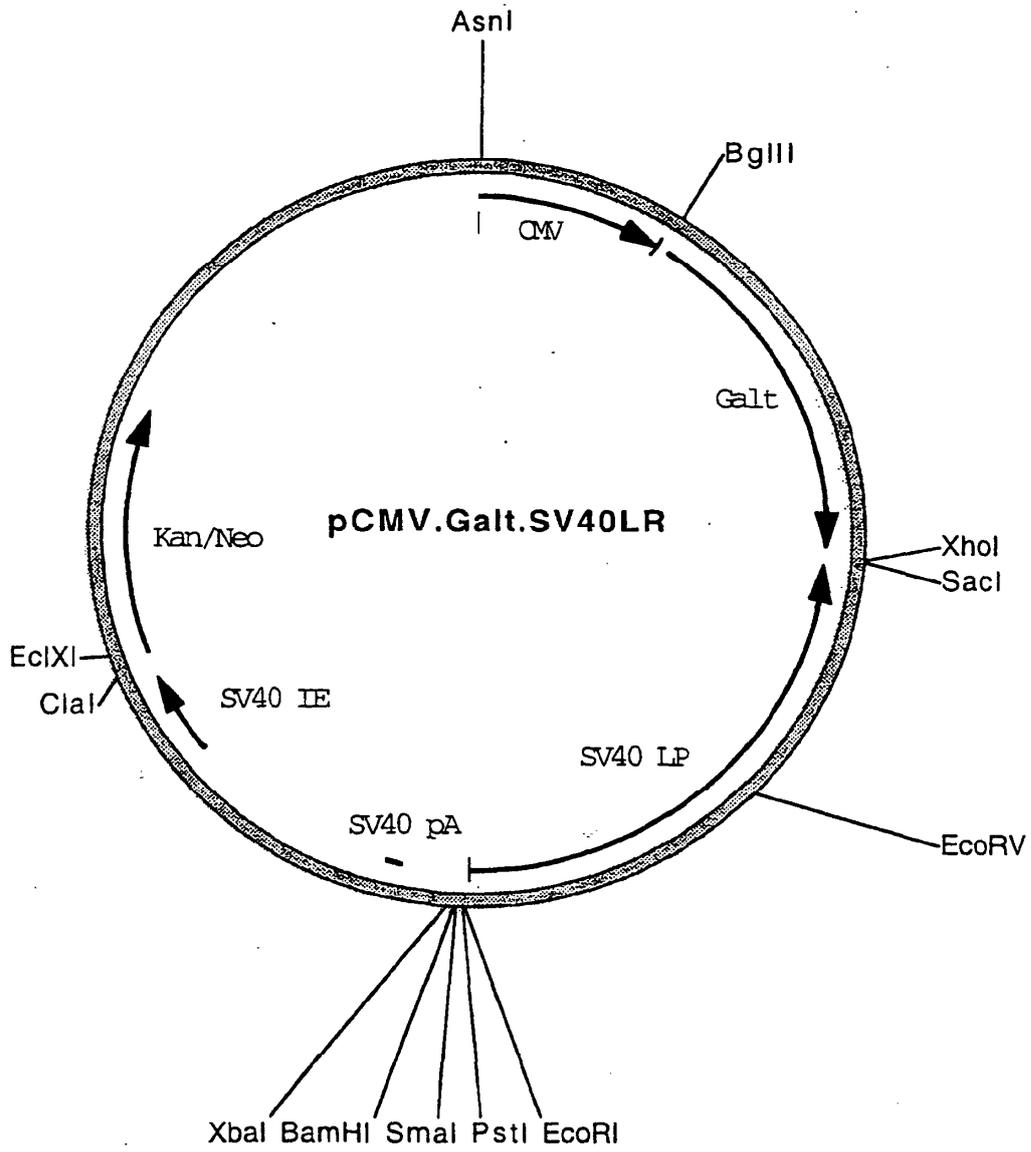
FIGURA 38



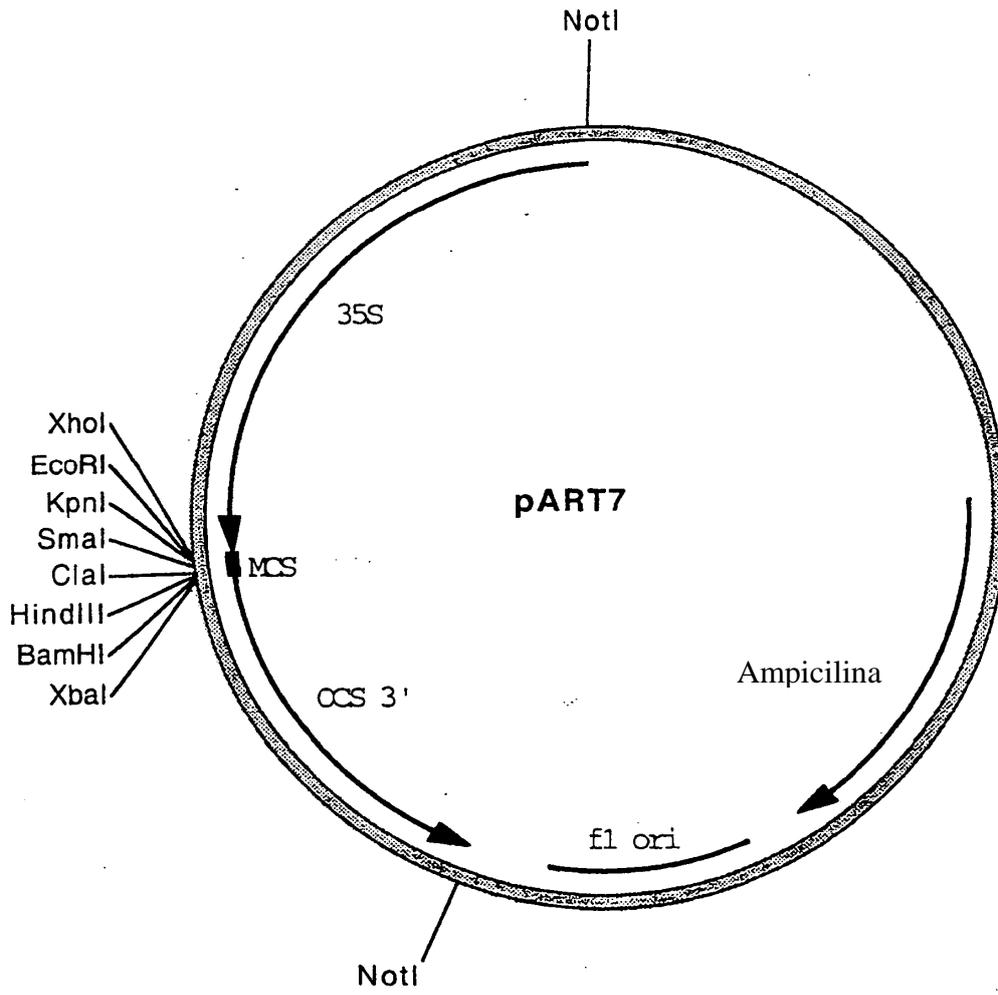
**FIGURA 39**



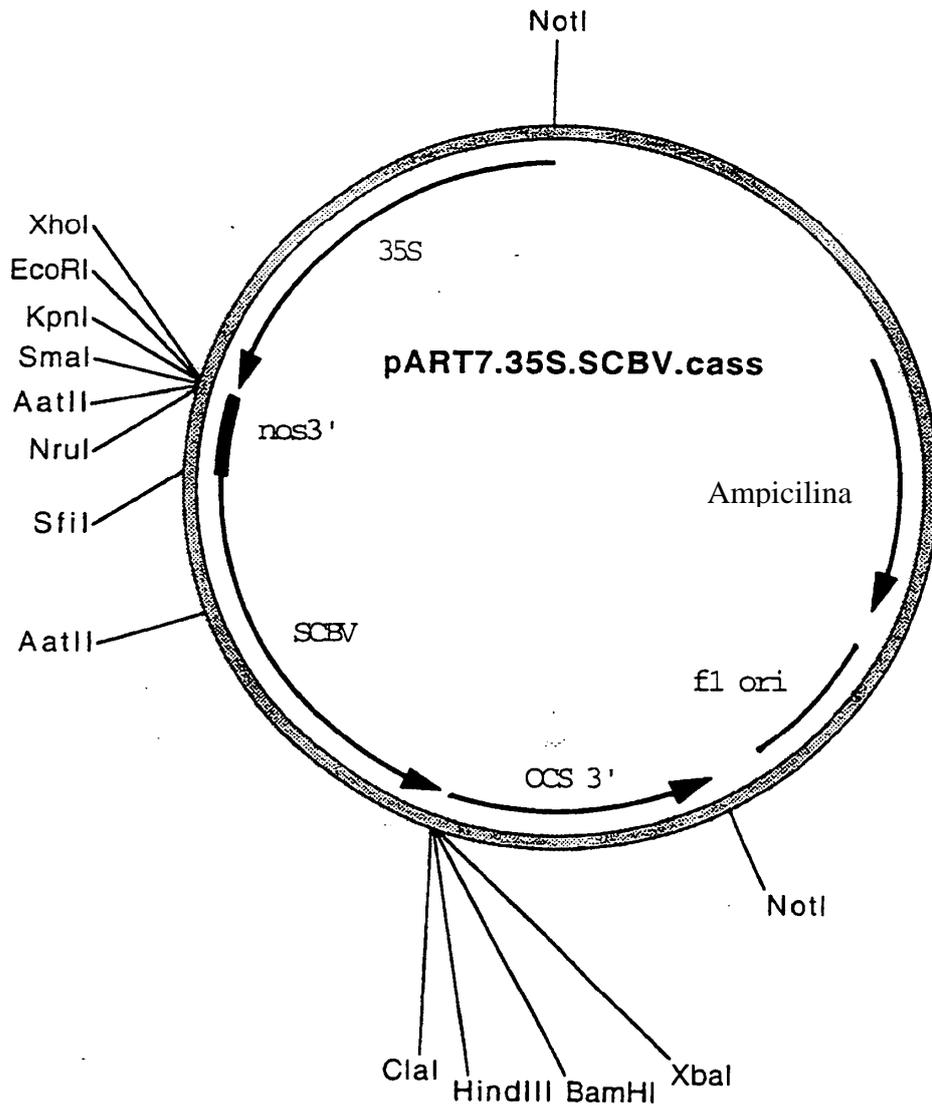
**FIGURA 40**



**FIGURA 41**



**FIGURA 42**



**FIGURA 43**

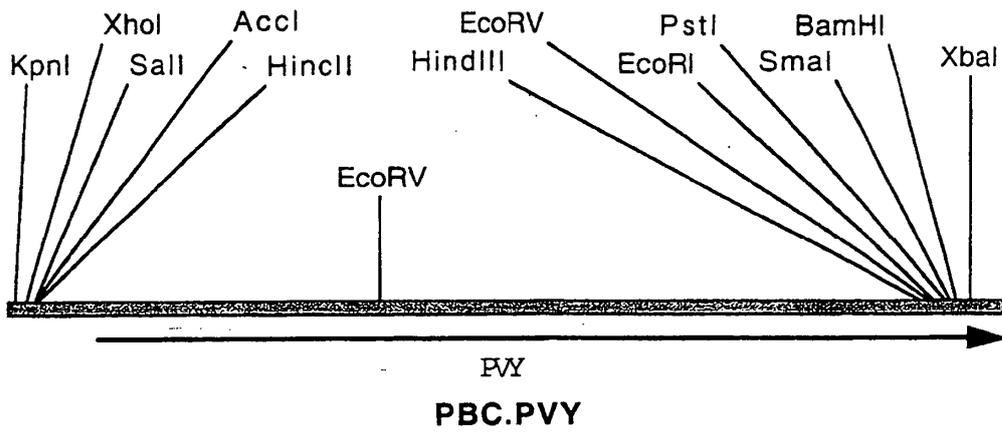
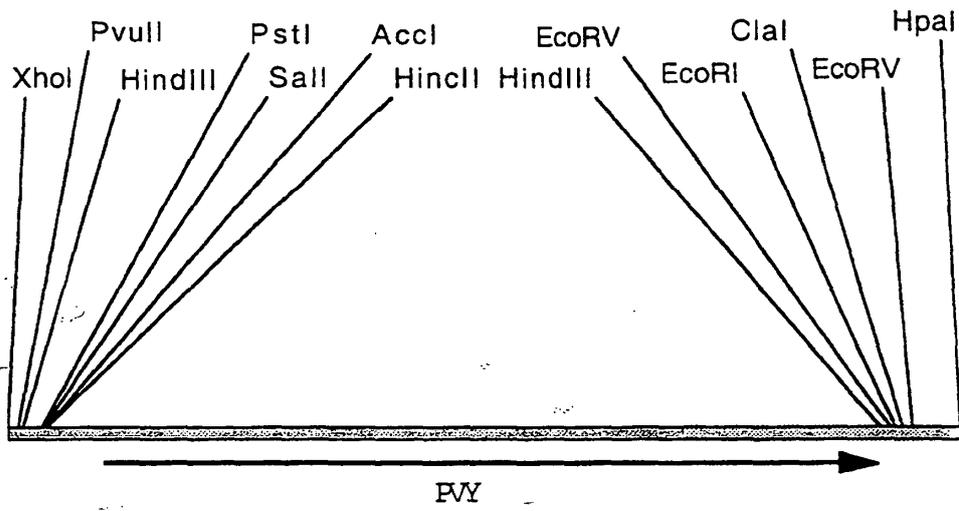
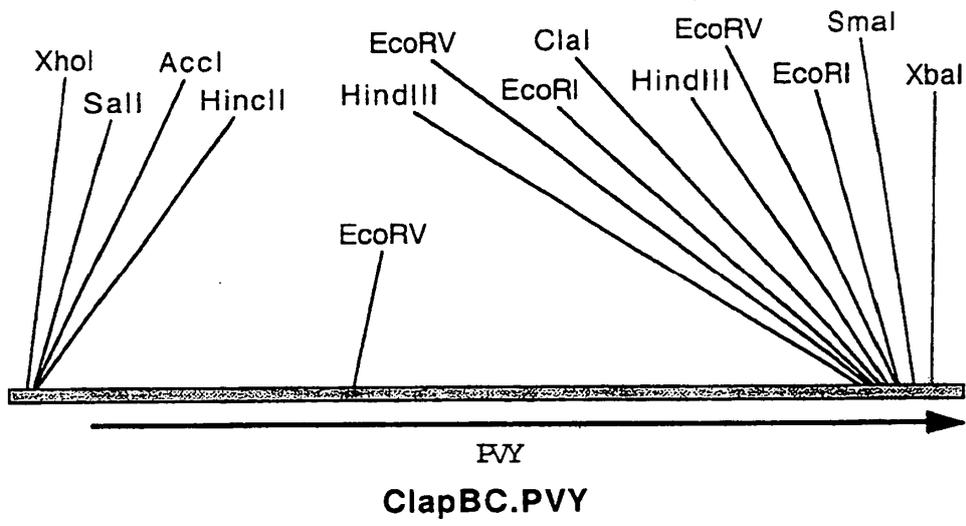


FIGURA 44

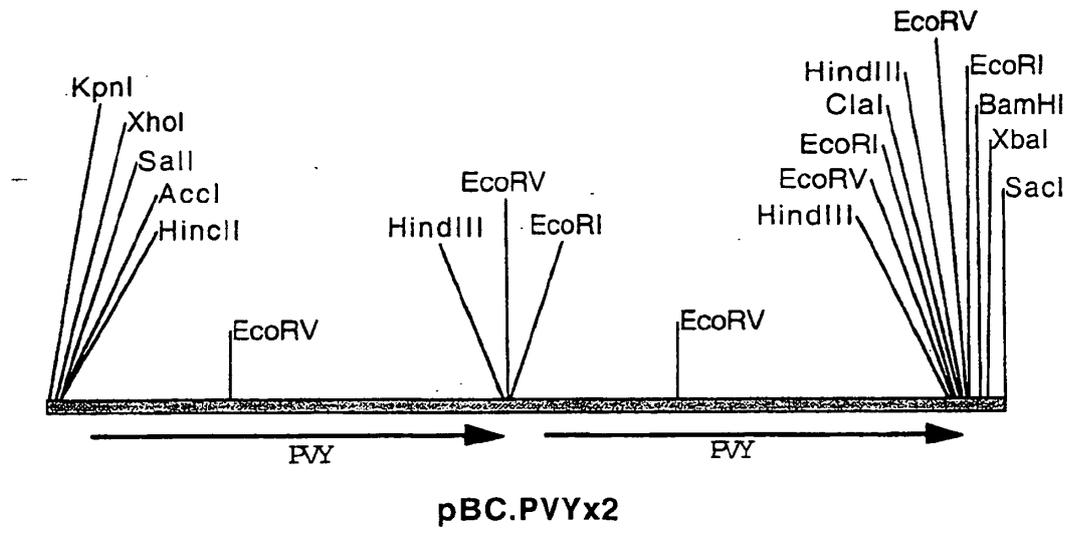


**pSP72.PVY**

**FIGURA 45**



**FIGURA 46**



**FIGURA 47**

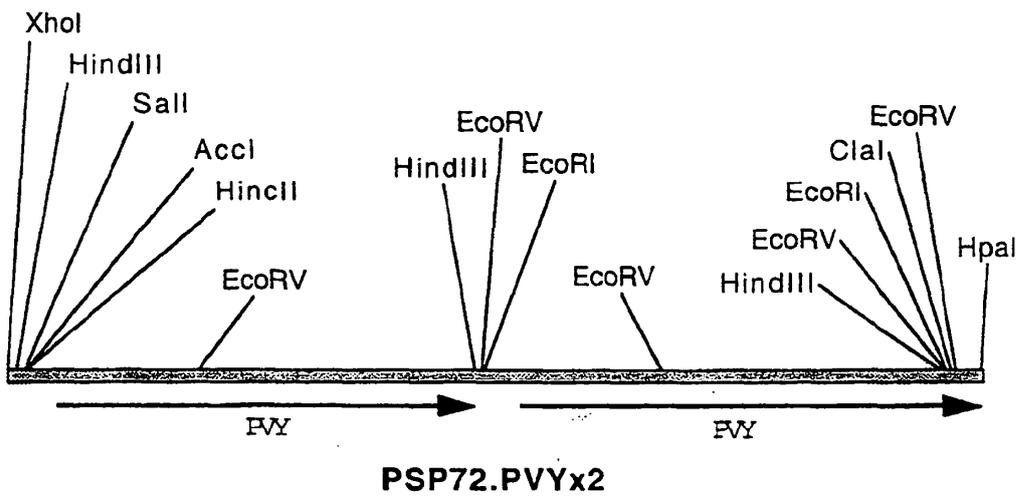


FIGURA 48

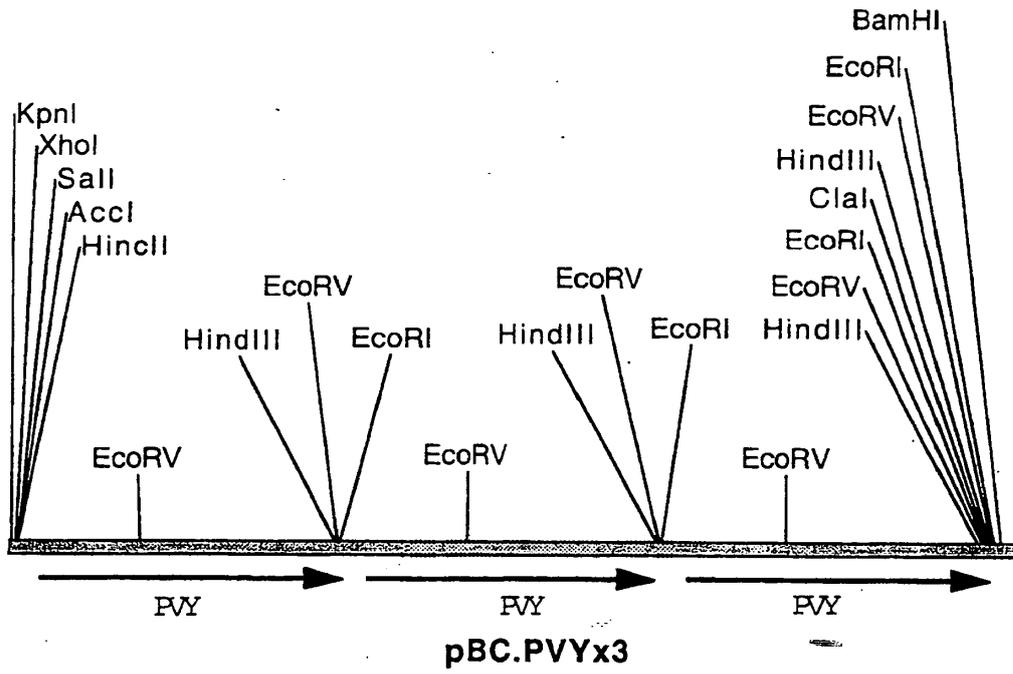
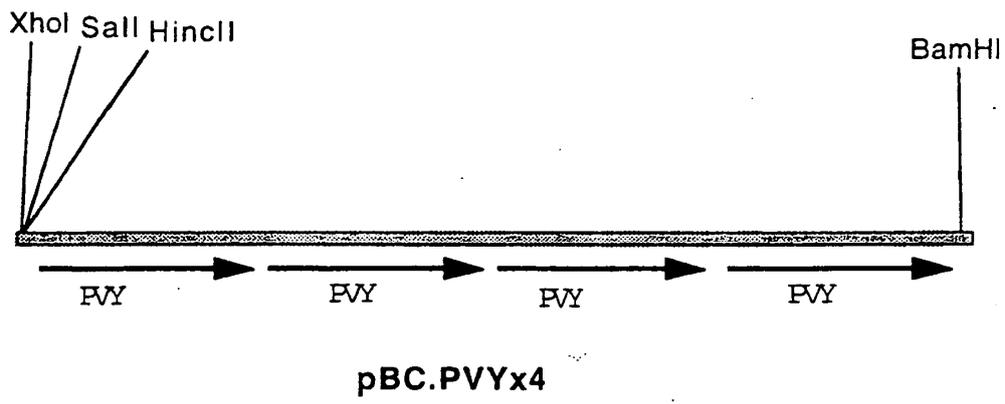
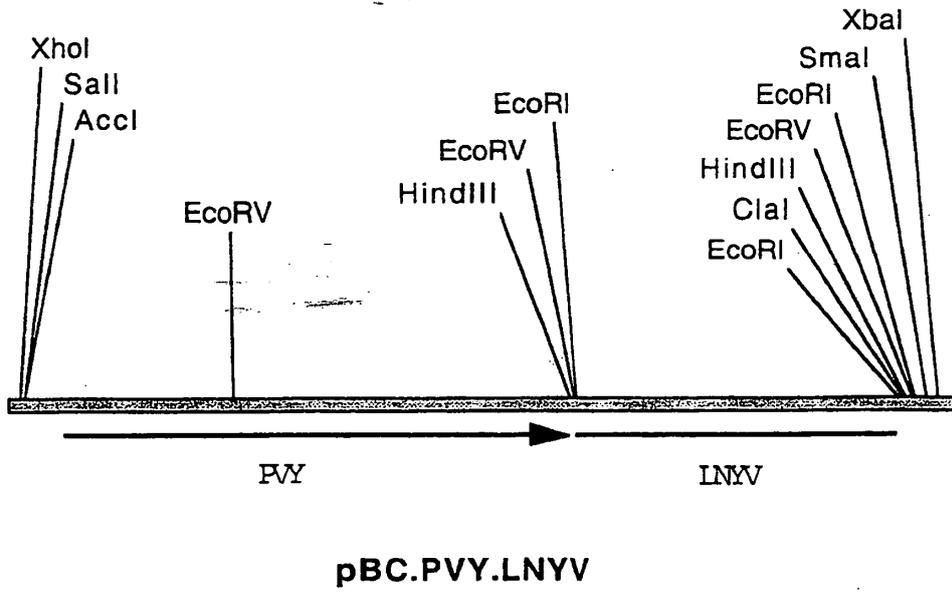


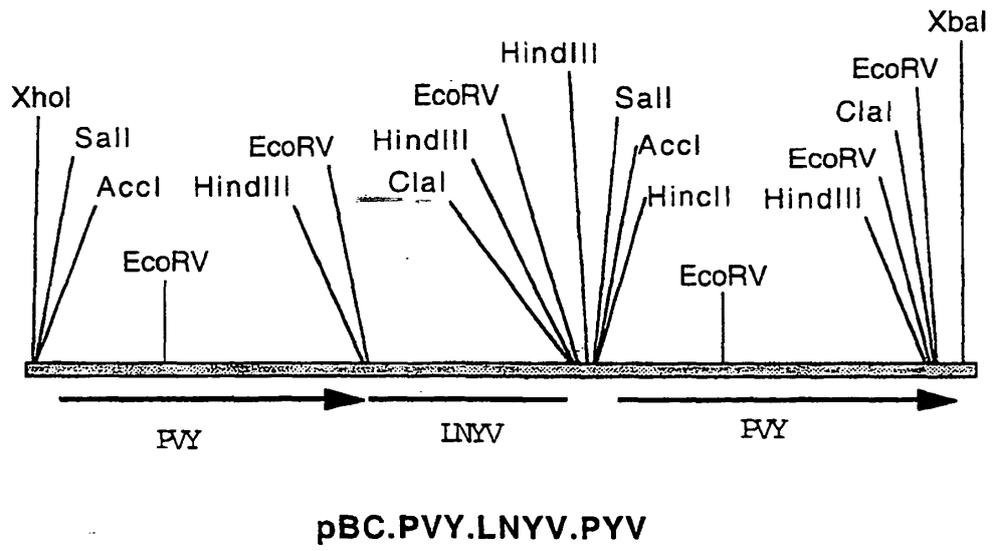
FIGURA 49



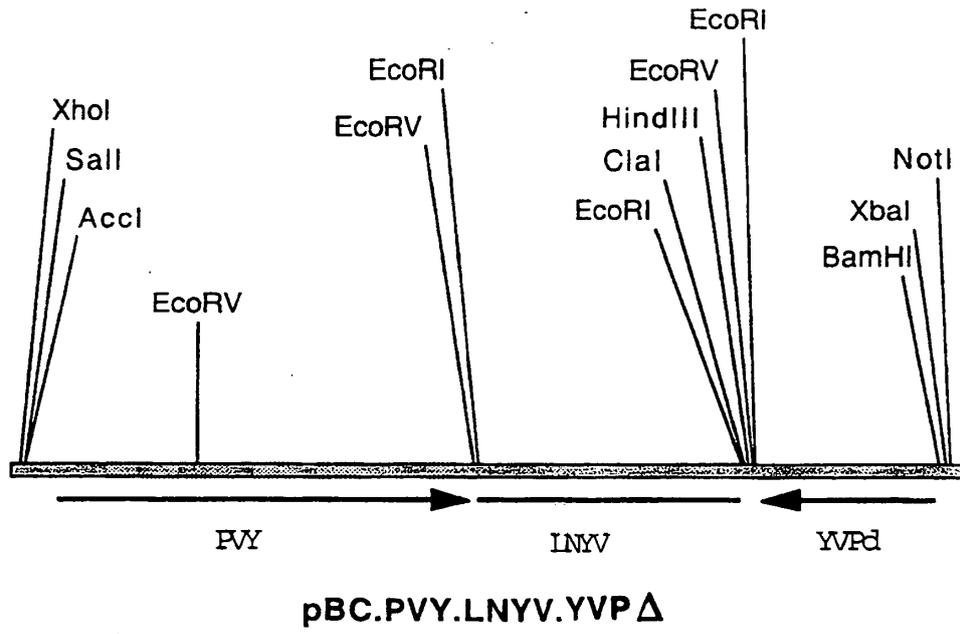
**FIGURA 50**



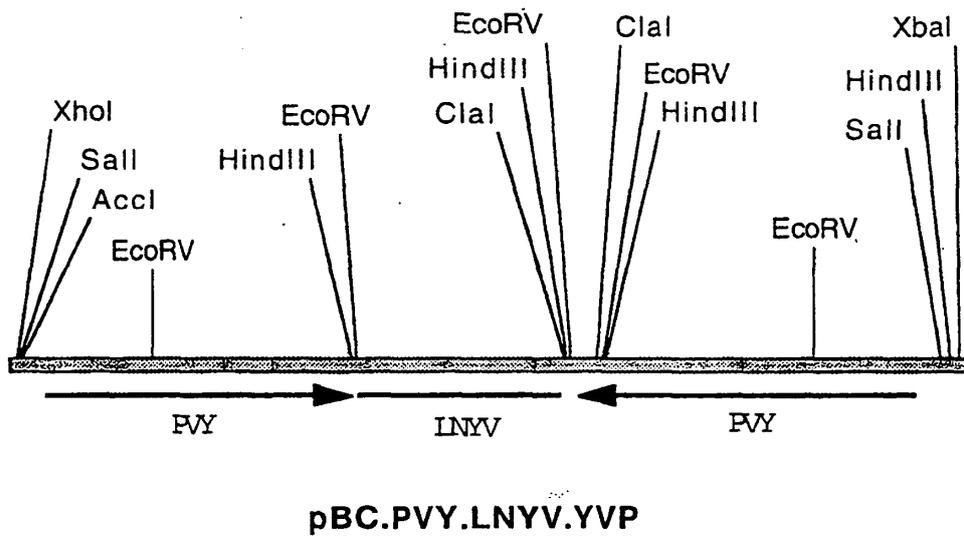
**FIGURA 51**



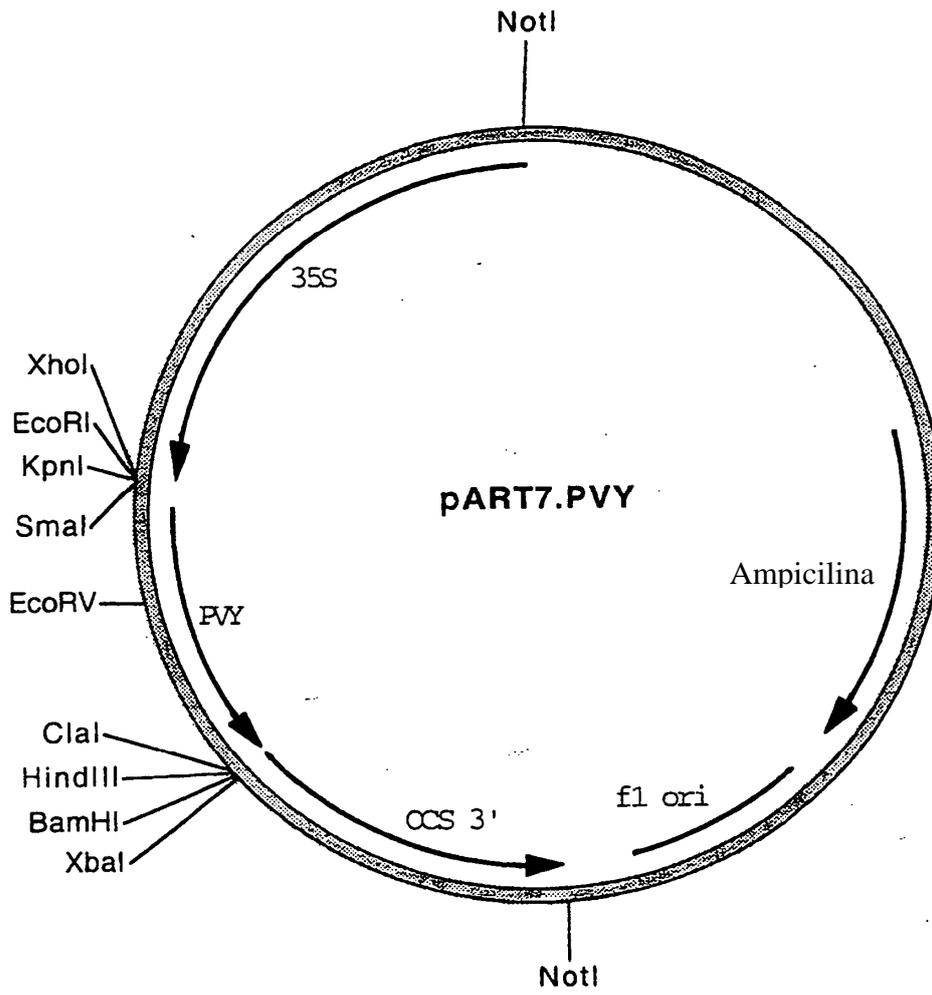
**FIGURA 52**



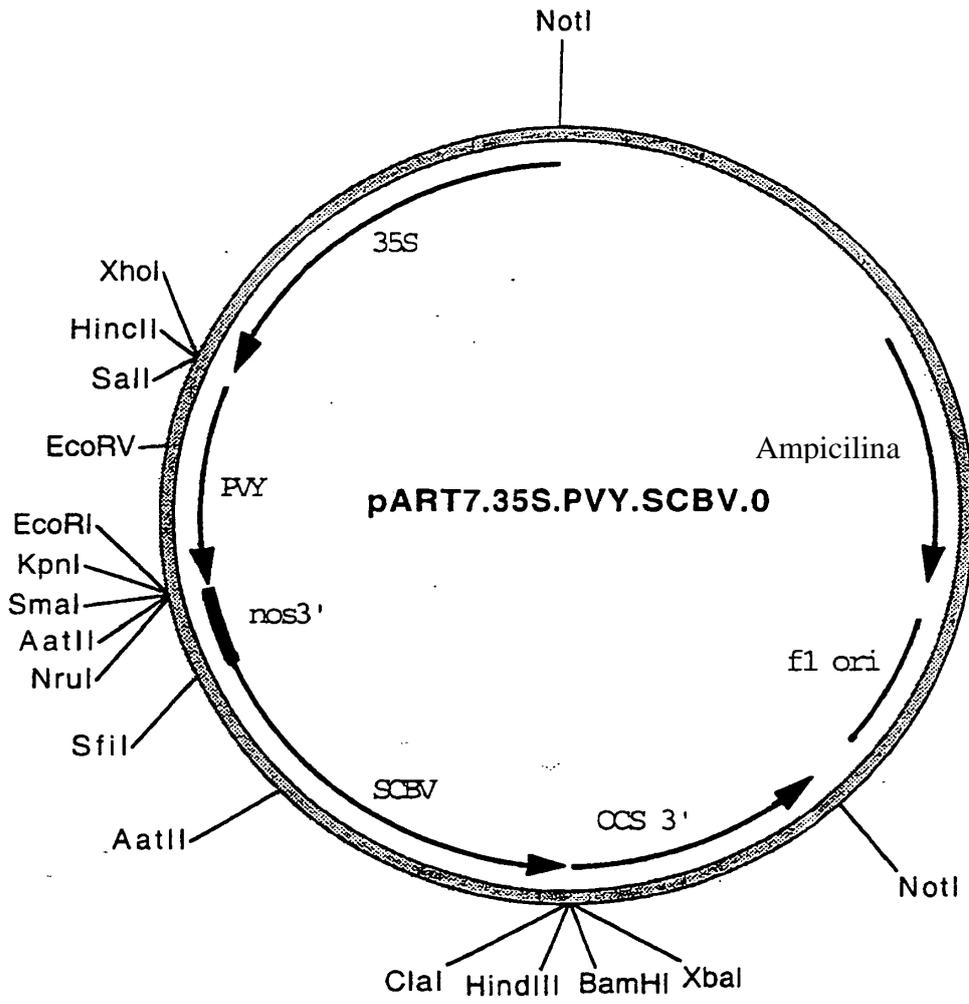
**FIGURA 53**



**FIGURA 54**



**FIGURA 55**



**FIGURA 56**

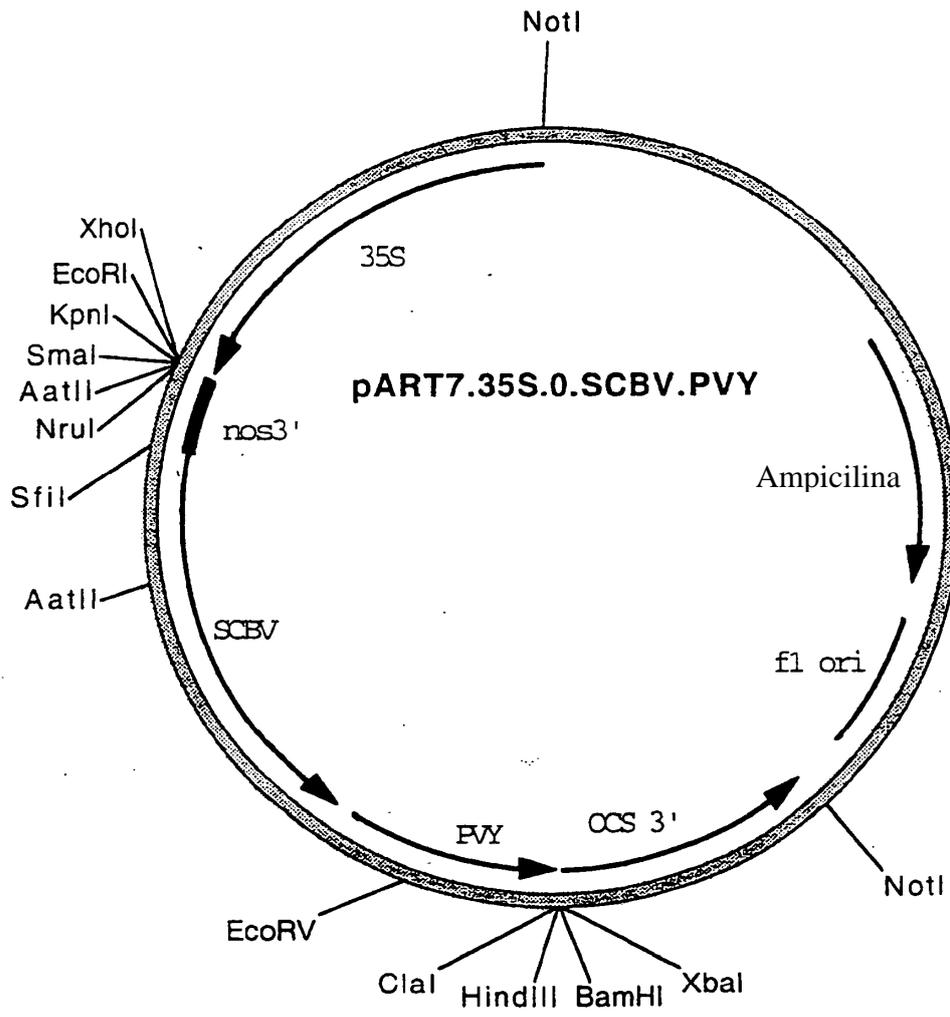
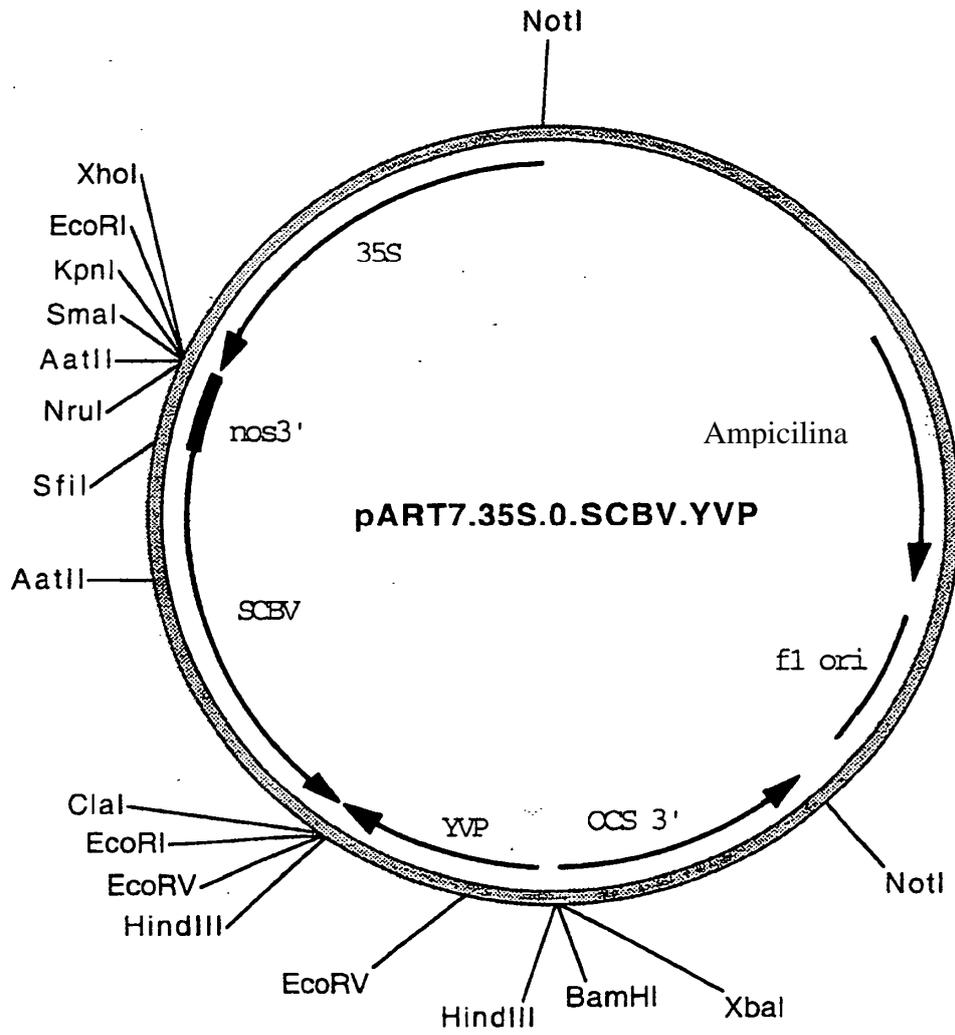
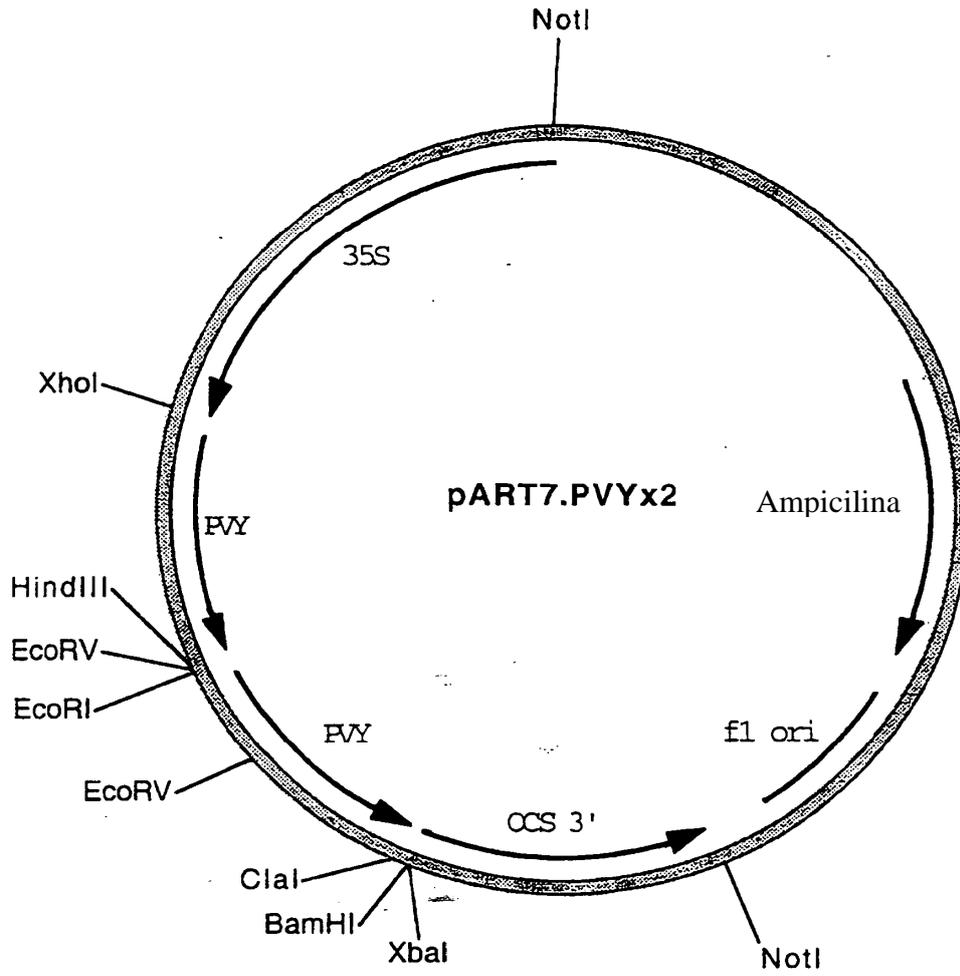


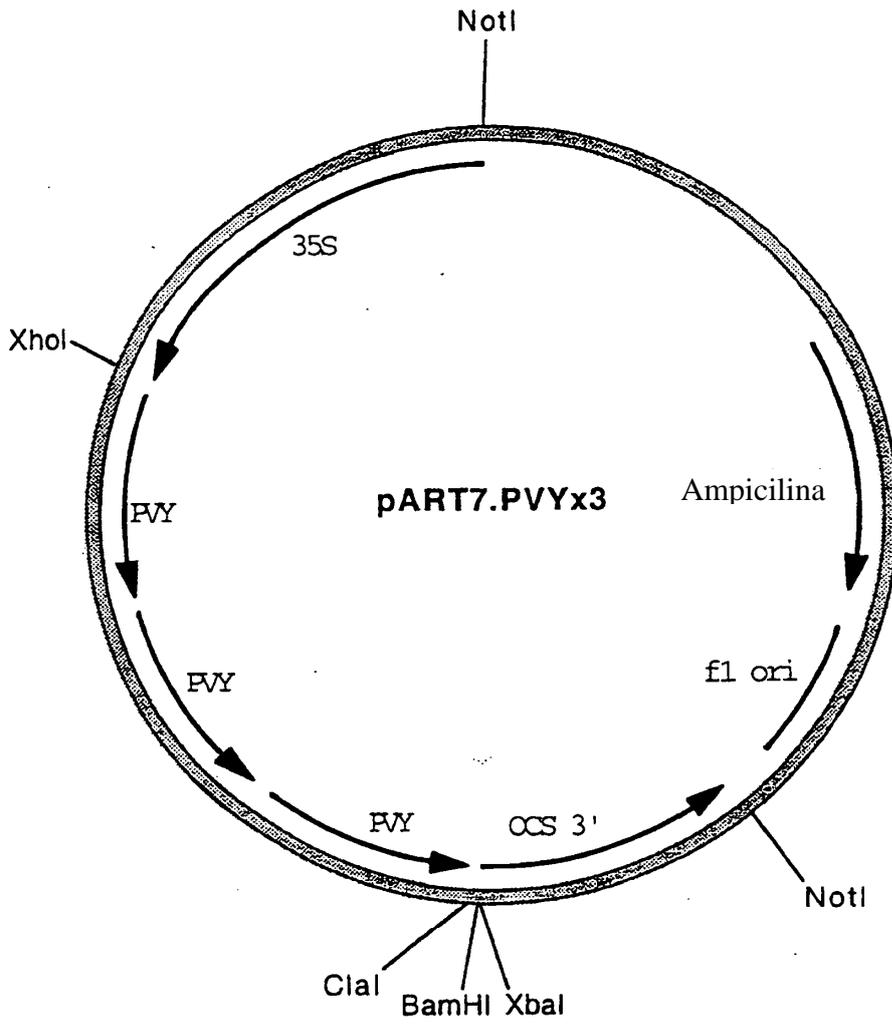
FIGURA 57



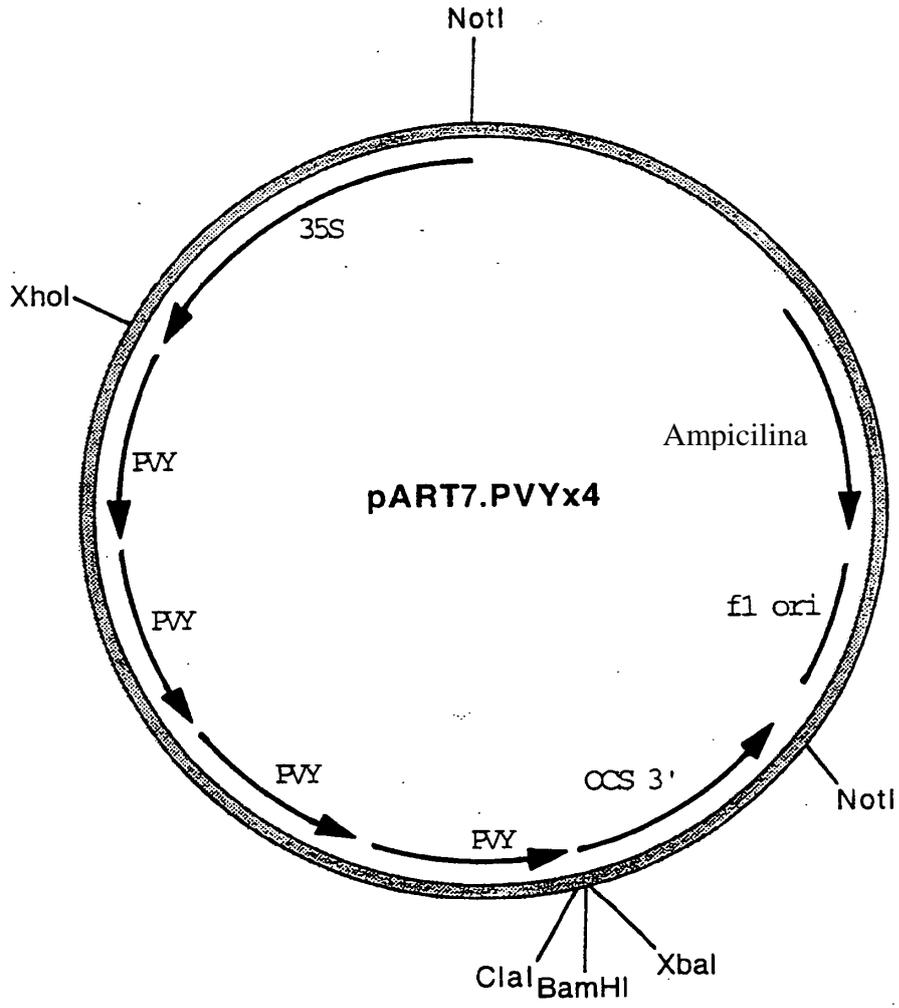
**FIGURA 58**



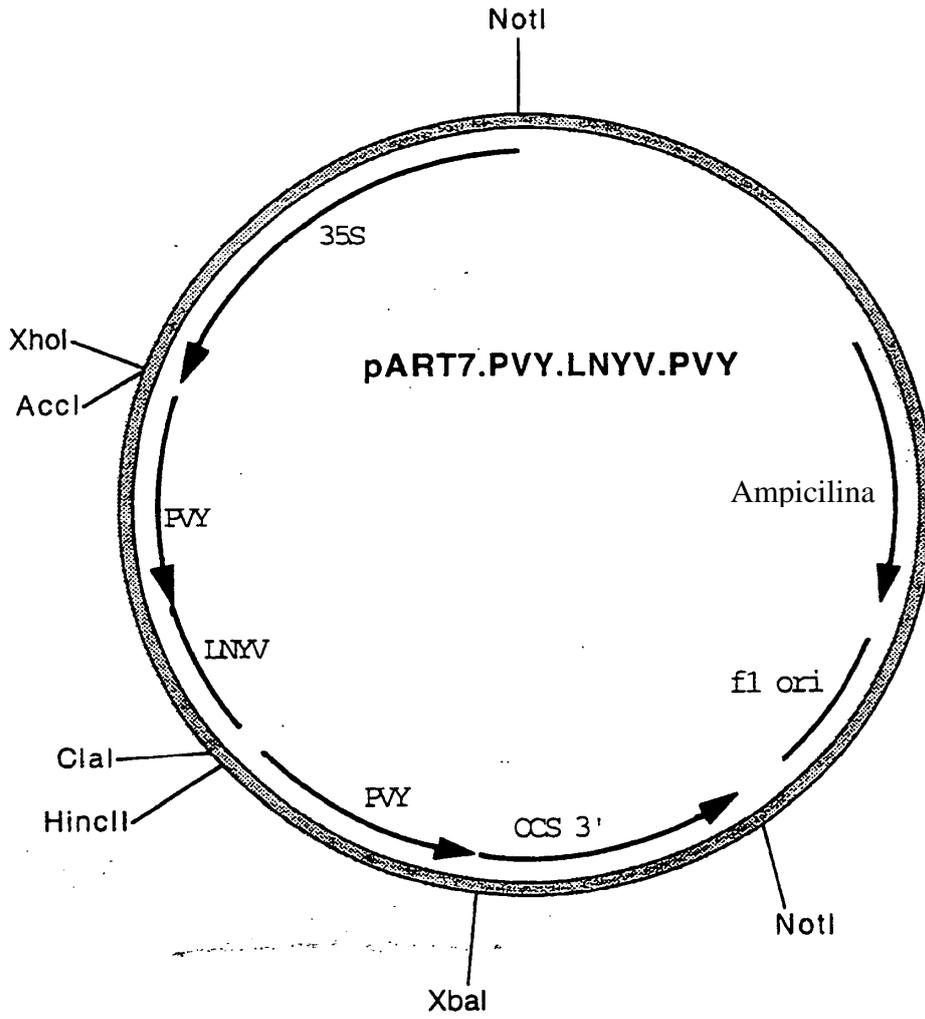
**FIGURA 59**



**FIGURA 60**



**FIGURA 61**



**FIGURA 62**

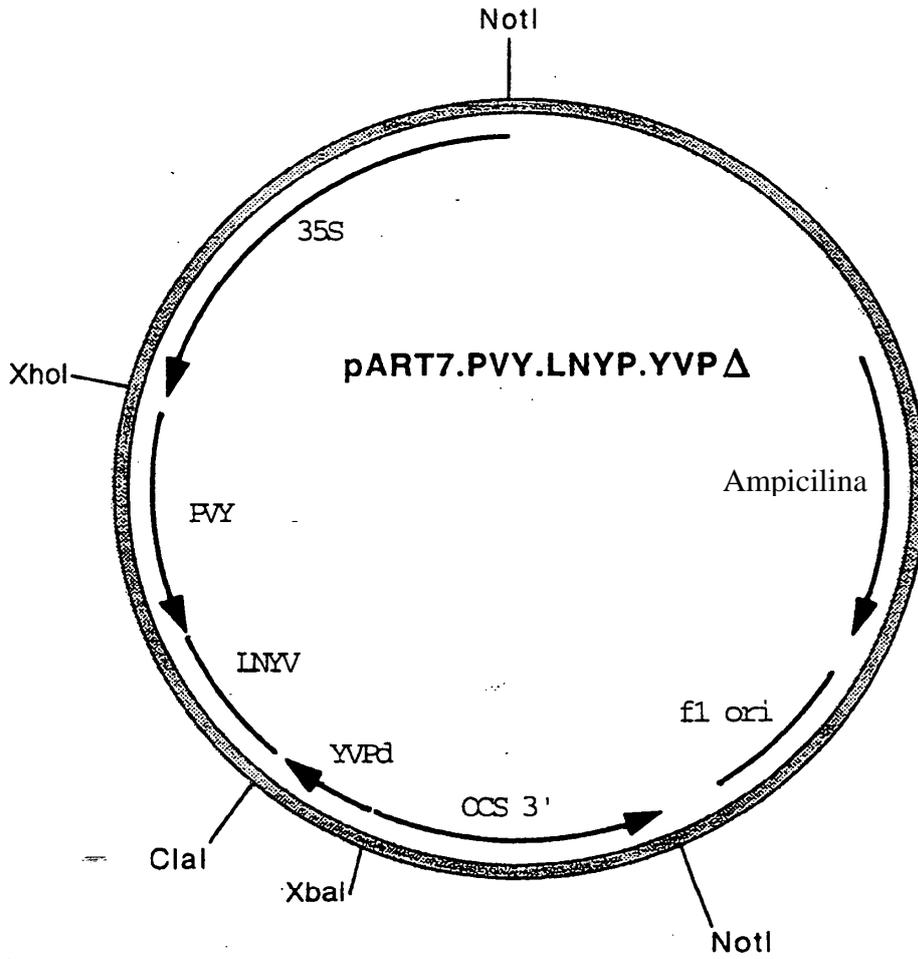
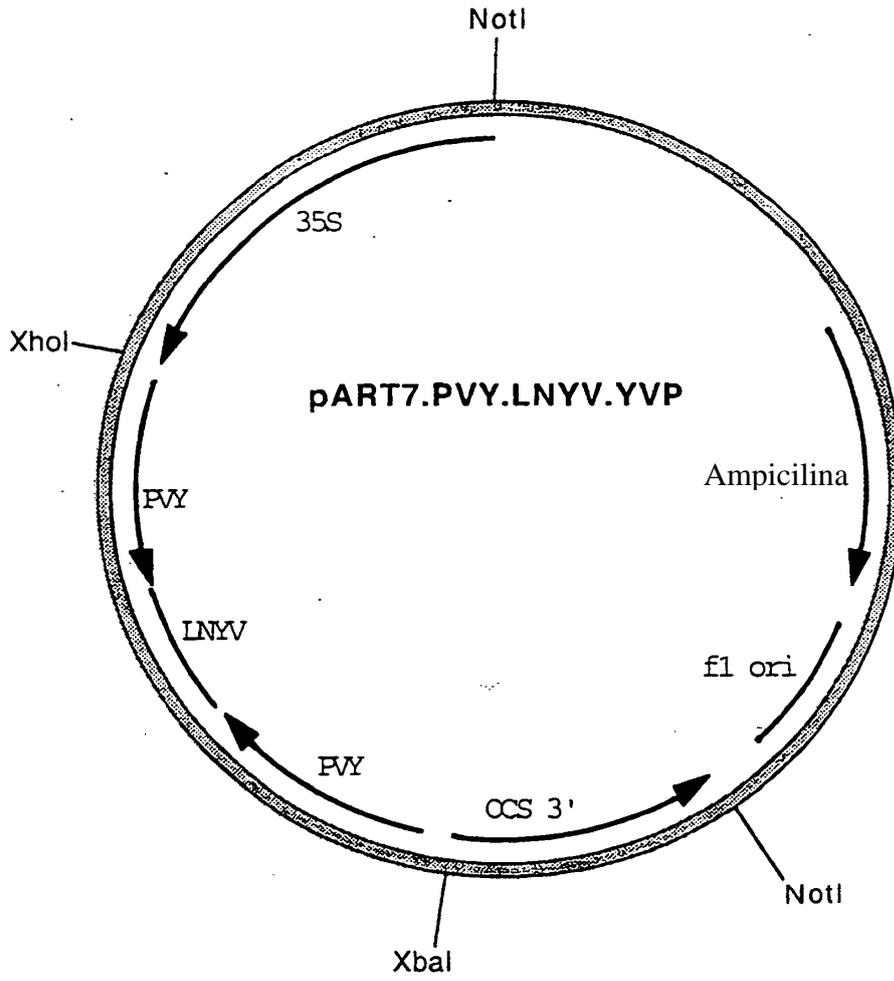
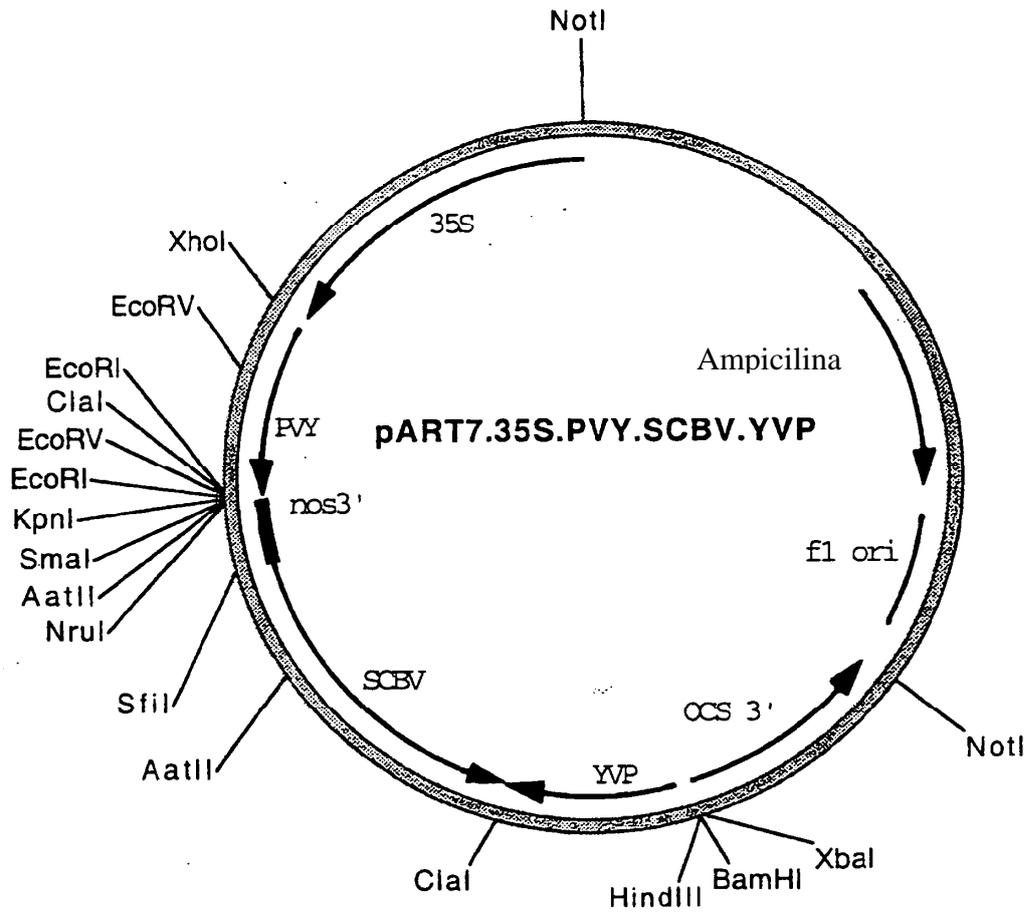


FIGURA 63



**FIGURA 64**



**FIGURA 65**

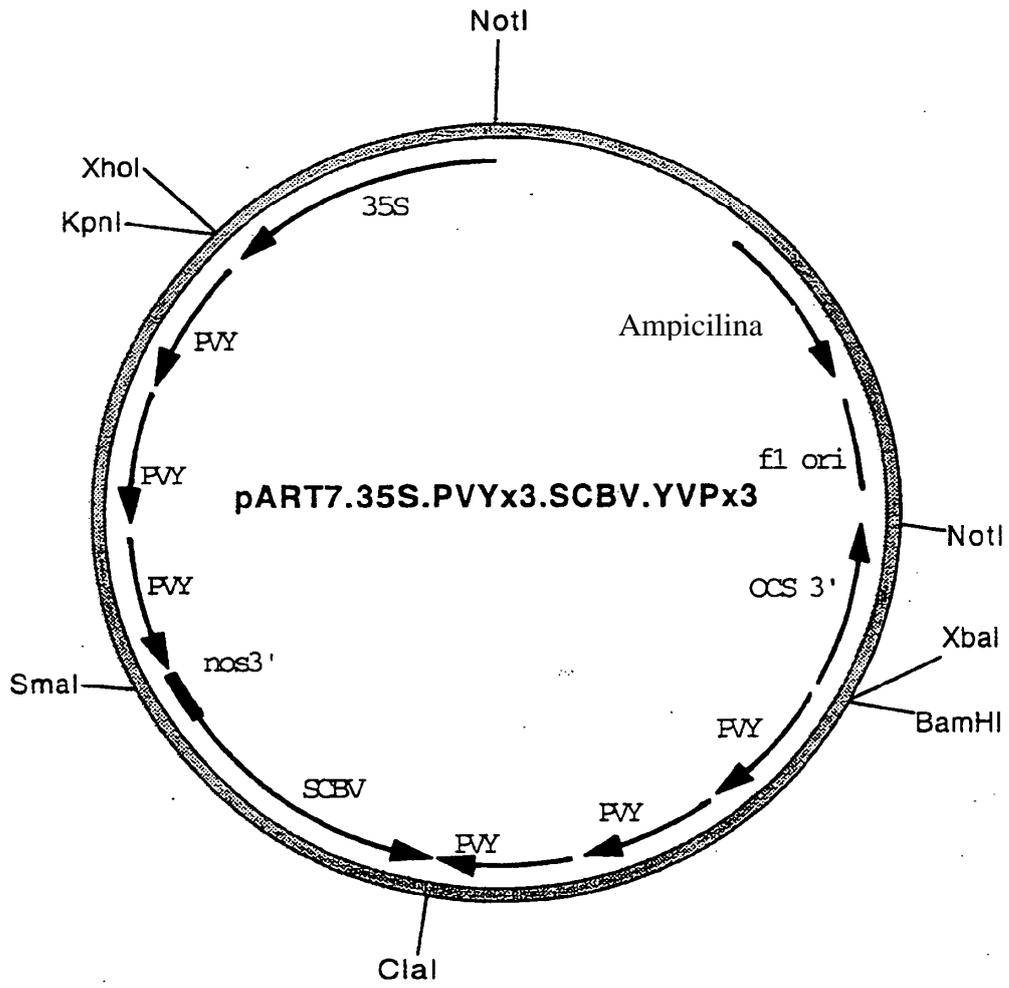
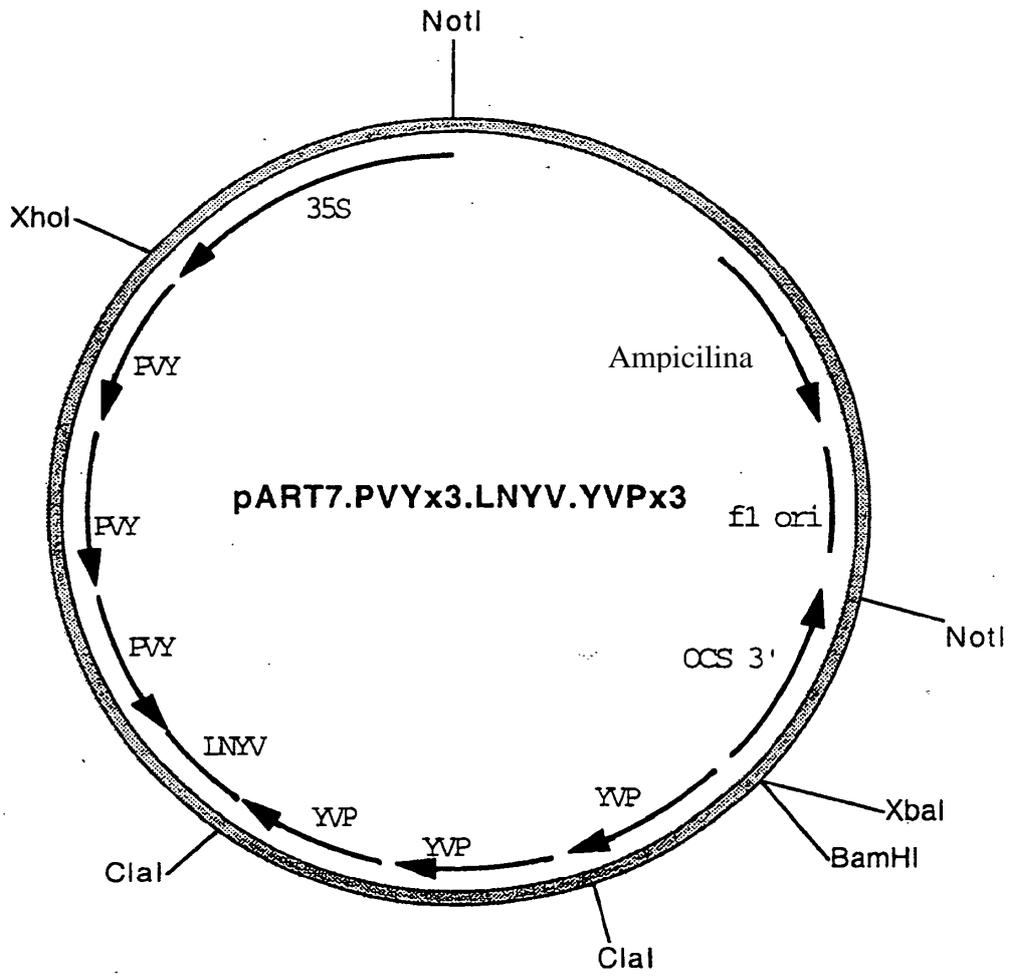


FIGURA 66



**FIGURA 67**

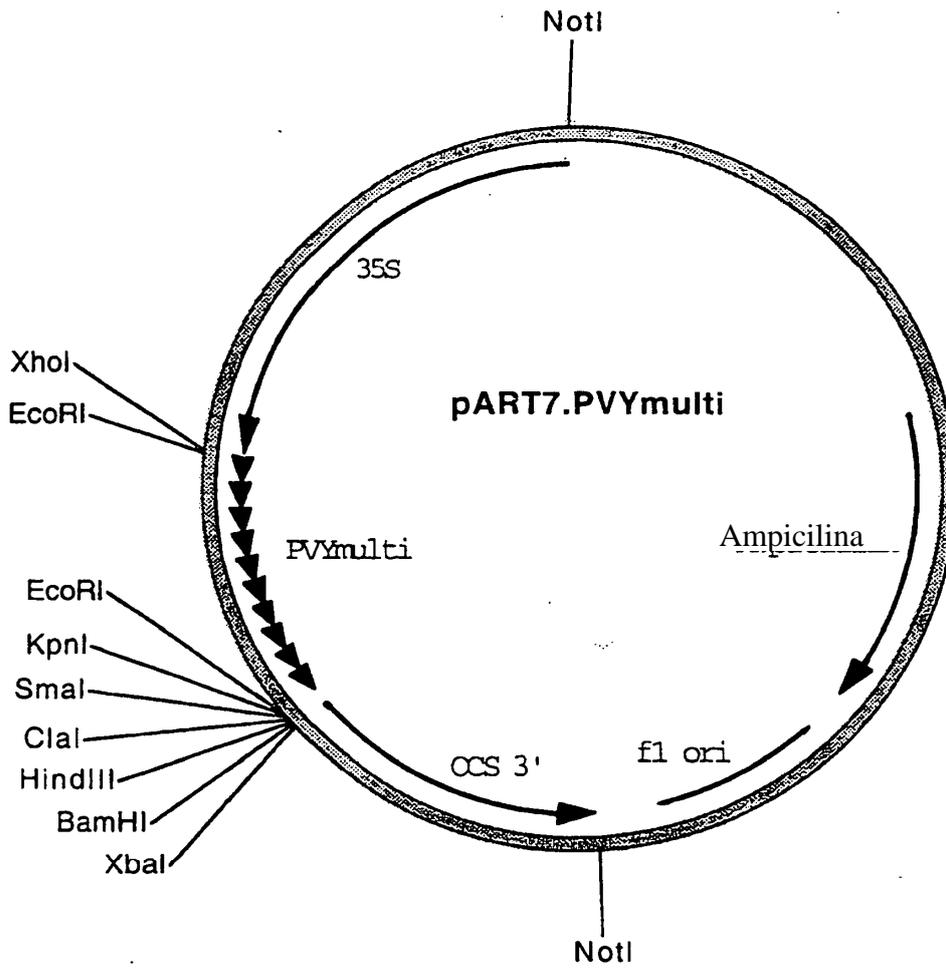


FIGURA 68