

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 039**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/00** (2006.01)  
**C12N 15/86** (2006.01)  
**C12N 15/90** (2006.01)  
**A01K 67/027** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07007307 .7**  
96 Fecha de presentación: **19.03.1990**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1826215**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2007**

54 Título: **Procedimiento para obtener la expresión, o para mejorar la tasa de expresión, de un gen**

30 Prioridad:  
**20.03.1989 FR 8903630**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.05.2012**

73 Titular/es:  
**INSTITUT PASTEUR  
25-28, RUE DU DOCTEUR ROUX  
75724 PARIS CEDEX 15, FR**

72 Inventor/es:  
**Le Mouellic, Hervé y  
Brulet, Philippe**

74 Agente/Representante:  
**Curell Aguilá, Mireia**

ES 2 381 039 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

Procedimiento para obtener la expresión, o para mejorar la tasa de expresión, de un gen.

- 5 La invención se refiere a un procedimiento de sustitución específica de una copia de un gen presente en el genoma de un organismo eucariota receptor que no es un embrión humano mediante la integración de un gen diferente del gen inactivado. Preferentemente, el gen receptor estará presente en por lo menos 2 ejemplares en la célula huésped transfectada. El gen receptor se define como el gen en el que se realizará la inserción del gen diferente.
- 10 Más particularmente, la invención se refiere a la producción de animales transgénicos no humanos en los cuales el gen extraño se ha introducido de forma localizada para permitir a la vez el mantenimiento de las funciones genéticas normales del animal y la expresión del gen extraño bajo el control de promotores endógenos.
- 15 Por "gen diferente o extraño" se entiende cualquier secuencia nucleotídica que corresponda a la totalidad o a una parte de un gen "extraño o diferente" del gen receptor, tal como se encuentra normalmente en el genoma (ARN o ADN), o corresponde asimismo a una secuencia modificada artificialmente del gen normal o incluso a un fragmento de dicha secuencia.
- 20 La invención se refiere asimismo al procedimiento de producción de estos animales transgénicos no humanos.
- 25 En la producción de animales transgénicos, los métodos convencionales utilizados para la introducción de secuencias de ADN heterólogas en la progenie celular germinal, no permiten controlar el sitio de integración del gen extraño en el genoma, ni el número de copias introducido de esta forma. La integración del gen extraño se realiza al azar y, en general, varias copias del gen se integran a la vez, a veces en forma de tándem cabeza-cola, variando el sitio de integración y el número de copias integradas de un animal transgénico a otro.
- 30 Puede, por lo tanto, darse el caso de que genes celulares endógenos, situados en el punto de inserción se inactiven de esta manera, sin que esto se detecte fácilmente debido a las numerosas inserciones al azar. Si el producto de dichos genes es importante para el desarrollo del animal, éste se alterará de forma importante. Por otra parte, la inserción aleatoria del gen extraño puede realizarse en un sitio que no sea apropiado para la expresión del gen. Además, el hecho de que varíe el sitio y el número de inserciones de animal en animal, hace que la interpretación de los estudios de expresión resulte extremadamente difícil.
- 35 Un problema importante que se presenta en la producción de animales transgénicos es la obtención de la expresión del gen extraño. De forma general, se han llevado a cabo dos tipos de experimentos en los ratones.
- Los genes introducidos en la progenie germinal son:
- 40 - o bien genes "completos", que comprenden secuencias codificadoras flanqueadas por sus propias secuencias reguladoras;
- o bien genes compuestos, formados por la secuencia codificadora de un gen fusionada con la secuencia promotora de otro gen, perteneciendo incluso los dos fragmentos a veces a dos especies animales distintas.
- 45 Se ha podido de esta forma confirmar que la especificidad de la expresión de los genes en tal o cual tejido está determinada por su(s) secuencia(s) reguladoras.
- 50 La elección del promotor apropiado para la expresión del gen extraño en el animal transgénico posee, por tanto, una importancia primordial.
- Por otra parte, la mutagénesis dirigida de genes murinos en células embrionarias se ha llevado a cabo recientemente apelando a una técnica de "administración genética dirigida" (gene targeting) (Thomas *et al.*, 1987; Doetschman *et al.*, 1988; Thompson *et al.*, 1989).
- 55 En los dos primeros casos, el gen murino HPRT ha sufrido una mutación mediante inserción y reemplazamiento y, en el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> caso, se ha corregido un gen HPRT mutado. Thomson *et al* han ampliado sus experiencias hasta la obtención de ratones quiméricos y han constatado el paso de la modificación genética a la progenie celular germinal.
- 60 En cada uno de los documentos citados, el sitio preciso de la integración se ha realizado de forma dirigida mediante recombinación homóloga entre, por una parte, las secuencias exógenas que incluyen la mutación o corrección incluidas en un vector bajo el control de un promotor exógeno, y, por otra parte, su homólogo genómico. Siendo así, es preciso subrayar que los autores anteriores han llevado a cabo sus experimentos en un gen específico (HPRT), cuya activación o inactivación mediante mutación se acompañaba de un fenotipo detectable. La mutación dirigida descrita por Thomas *et al.* tenía como efecto inactivar el gen HPRT y, en consecuencia, hacer desaparecer el fenotipo detectable normalmente asociado con el HPRT. El gen de selección Neo<sup>R</sup>, bajo el control de un promotor TK, se incorporaba por lo tanto al ADN de inserción para permitir la selección de los transformantes. Hay que
- 65

señalar que los experimentos descritos en la técnica anterior implicaban una selección, bien por el gen receptor (por ejemplo HPRT), o bien por el gen de inserción (por ejemplo, Neo<sup>R</sup>). El sitio de inserción y/o el tipo de gen insertado está por tanto limitado a los genes que confieren un carácter seleccionable, una selección directa.

5 Además, en la técnica anterior, las secuencias exógenas en el vector sirven por tanto a la vez para dirigir el sitio de integración y para introducir la modificación. A consecuencia de la recombinación homóloga, el gen modificado se encuentra siempre en su entorno genético normal.

10 Recordemos que un problema que se plantea durante la producción de animales transgénicos es el peligro de inactivar un gen celular endógeno que se encuentre en el punto de inserción del gen extraño.

Según la función del producto del gen inactivado, dicha inactivación puede conducir a alteraciones fisiológicas o morfológicas importantes en el animal transgénico, o bien podría incluso impedir su supervivencia.

15 En cambio, la inactivación de un gen podría considerarse como ventajoso si el gen en cuestión codificara para un receptor vírico u otro agente infeccioso.

20 Los inventores han estudiado la posibilidad de evitar los inconvenientes descritos anteriormente y asociados, en ciertos casos, a la posible inactivación de uno o varios genes celulares endógenos de función importante durante la producción de animales transgénicos no humanos.

25 La invención tiene por objeto un procedimiento de sustitución de un gen, especialmente mediante administración dirigida de un ADN, denominado ADN de inserción, constituido por una parte de un gen, susceptible de volverse funcional, o cuyo funcionamiento pueda volverse más eficaz, cuando se recombina con un ADN de complemento para poder entonces producir un gen recombinante completo en el genoma de una célula eucariota, caracterizado porque

- 30 - el sitio de inserción se encuentra en un gen seleccionado, denominado gen receptor, y que contiene el ADN de complemento, y porque
- se transfectan células eucariotas que no son ni células germinales humanas, ni células embrionarias humanas, con un vector que contiene una inserción que comprende a su vez el ADN de inserción y dos secuencias denominadas "flanqueadoras", a ambos lados del ADN de inserción, homólogas respectivamente a dos secuencias genómicas que lindan con el sitio de inserción deseado en el gen receptor,
- 35 - comprendiendo el ADN de inserción una parte de un gen y siendo heterólogo con respecto al gen receptor, y
- siendo las secuencias flanqueadoras seleccionadas con el fin de permitir, mediante recombinación homóloga con secuencias correspondientes del gen receptor, la expresión del ADN de inserción bajo el control de secuencias reguladoras del gen endógeno en el que se realiza la inserción y la reconstitución de un gen recombinante completo en el genoma de la célula eucariota, no codificando dicho gen recombinante para un producto de expresión que permite la selección de los transformantes.
- 40

45 Según el procedimiento de la invención, dicho ADN de inserción puede contener o bien una secuencia codificante o bien una secuencia reguladora, estando entonces el procedimiento caracterizado porque:

- el sitio de inserción se encuentra en un gen seleccionado denominado gen receptor y porque
- 50 - se transfectan células eucariotas con un vector que contiene una inserción que comprende a su vez el ADN de inserción y dos secuencias denominadas "flanqueantes" a ambos lados del ADN de inserción, respectivamente homólogas a dos secuencias genómicas que lindan con el sitio de inserción deseado en el gen receptor,
- siendo el ADN de inserción heterólogo con respecto al gen receptor, y
- 55 - siendo las secuencias flanqueantes seleccionadas con el fin de permitir por recombinación homóloga la expresión de la secuencia codificadora del ADN de inserción completo bajo el control de las secuencias reguladoras del gen receptor.

60 Por ejemplo, el ADN de inserción puede contener una secuencia codificadora desprovista de elemento de regulación, en particular de un promotor que le es propio.

65 La invención se refiere asimismo a un procedimiento de producción de animales transgénicos no humanos, caracterizado porque células E.S. son transfectadas en las condiciones que se acaban de describir y seleccionadas para el acontecimiento de recombinación homóloga, a saber la integración correcta del gen extraño, las células transfectadas son inyectadas en embriones no humanos en un estadio en el que son aptos para integrar las células transfectadas (por ejemplo, en el estadio de blastocisto), los embriones son reimplantados a continuación en una

madre portadora y se acoplan los individuos quiméricos obtenidos al final de la gestación, y en los cuales se constata la colonización por las células E.S. no humanas de la progenie germinal. Si las células E.S. han colonizado la progenie germinal del animal quimérico, se obtendrán animales transgénicos heterocigóticos para el gen sustituido mediante unión ( $F_1$ ) en la descendencia.

5 Es posible asimismo insertar el ADN de inserción, transportado por el vector de la invención, en el huevo no humano, poco tiempo después de la fecundación (es decir, menos de 24 horas). De esta forma, la inserción se efectúa cuando el huevo se encuentra en estado unicelular.

10 La invención se refiere asimismo a un plásmido apto para efectuar la inserción dirigida de un gen recombinante denominado gen de inserción en el genoma de una célula eucariota, caracterizado porque contiene una inserción que comprende a su vez el gen de inserción y dos secuencias denominadas "flanqueadoras", a ambos lados del gen de inserción, homólogas respectivamente a las dos secuencias genómicas que lindan con el sitio de inserción deseado en el gen receptor.

15 El ADN de inserción puede ser una parte de un gen, heterólogo a la especie transfectada.

La invención se refiere asimismo a unos animales transgénicos no humanos en los cuales al menos un gen endógeno, que preferentemente está presente en el genoma con al menos dos ejemplares, ha sido inactivado por la inserción de un gen que es diferente del gen inactivado, siendo el gen de inserción insertado en una posición que permite la expresión de este gen bajo el control de las secuencias reguladoras del gen endógeno inactivado.

20 El procedimiento de la invención permite por tanto, gracias al fenómeno de recombinación homóloga, insertar de una forma dirigida genes extraños, en particular secuencias codificadoras desprovistas del promotor con el que normalmente se asocian, en el genoma de un organismo eucariota no humano, en un sitio que permite su expresión bajo el control del promotor endógeno del gen en el que se realiza la inserción, y en consecuencia, inactivar el gen endógeno dirigido.

25 Según un modo de realización preferido de la invención, el gen receptor localizado es un gen que está presente en el genoma en por lo menos dos ejemplares. La utilización de la técnica de electroporación (Ref. 11), asegura la introducción de sólo una copia del gen extraño.

30 Según esta variante de la invención, la inserción dirigida del gen de interés (es decir, del gen denominado de inserción), tiene por efecto inactivar la única copia del gen celular endógeno en el que se lleva a cabo la inserción y deja intacta y funcional la(s) otra(s) copia(s) de dicho gen.

35 De esta manera, el funcionamiento genético del animal transgénico no humano no se altera o se altera poco por la introducción del gen extraño, aún en el caso de que la inserción inactive una única copia de un gen receptor esencial para el desarrollo del animal. O bien, su desarrollo no se vería por tanto afectado por la inserción del gen extraño o bien las alteraciones menores posibles en el caso de la inactivación de un gen crítico no serían probablemente letales para el animal no humano. Los efectos de la inserción del gen extraño en el estado homocigoto, podrían ser de cualquier tipo y se observarían en la 2ª generación ( $F_2$ ), tras cruzamientos de individuos heterocigotos ( $F_1$ ) entre ellos.

40 Si, por el contrario, se desea la inactivación de todas las copias de un gen, por ejemplo, en el caso en el que el gen codifique para un receptor de agente infeccioso, se introducen múltiples copias del gen extraño. El control de la cantidad introducida puede asegurarse apelando a técnicas conocidas.

45 La inserción dirigida del gen extraño permite por tanto su introducción en un sitio en el que su expresión está bajo el control de las secuencias reguladoras del gen endógeno en el que se realiza la inserción.

50 El procedimiento de la invención permite de este modo insertar el gen extraño detrás de un promotor endógeno que posee las funciones deseadas (por ejemplo, especificidad de expresión en tal o cual tejido), y ello, llegado el caso, sin inactivar las otras copias del gen receptor.

55 Según un modo de realización preferido, el vector, contiene unas secuencias intercaladas entre el ADN de inserción y las secuencias flanqueantes. Estas secuencias pueden contener por ejemplo una secuencia que codifica para un agente selectivo que permite la selección de los transformantes y eventualmente un gen marcador por ejemplo el LacZ.

60 Según un modo de realización particularmente preferido de la invención, el ADN de inserción incluye entre las secuencias flanqueadoras, por una parte, una secuencia de ADN destinada a ser recombinada con el ADN de complemento en el gen receptor para proporcionar un gen recombinante y, por otra parte, una secuencia que codifica para un agente selectivo que permite la selección de los transformantes y un promotor que permita la expresión de un agente selectivo, codificando el gen receptor y el gen recombinante para productos de expresión que no confieren fenotipo seleccionable.

Según esta variante, la inserción del plásmido de la invención comprende, entre las secuencias flanqueantes, por una parte una secuencia de ADN destinada a ser recombinada con el ADN de complemento en el gen receptor, y, por otra parte, una secuencia que codifica para un agente selectivo que permite la selección de los transformantes y un promotor que permite la expresión del agente selectivo, siendo la secuencia de ADN destinada a ser recombinada con el ADN de complemento, distinta de un gen que codifica para un agente selectivo.

De esta forma, la selección de los transformantes es independiente por completo de la naturaleza del gen receptor y del gen insertado, contrariamente a los procedimientos descritos hasta ahora, en los cuales el gen insertado o el gen receptor debía necesariamente codificar para un producto de expresión que permitiera la selección de los transformantes. El sistema desarrollado por los inventores permite una flexibilidad total en lo que se refiere a la naturaleza del gen receptor y del gen insertado o del gen formado por la recombinación homóloga. Los inventores han constatado de una manera sorprendente que la inserción de secuencias de tamaño importante (por ejemplo, de aproximadamente 7,5 kb), no afecta a la frecuencia de recombinación homóloga.

El efecto que puede tener la inserción de la secuencia de ADN según este aspecto de la invención incluye, según el tipo de secuencia insertada, por ejemplo, la sustitución de una secuencia codificadora, la sustitución de una secuencia reguladora, la inactivación o la reactivación de un gen mediante mutación o la mejora de la tasa de expresión de un gen. Es posible, según la invención, sustituir una fase codificadora o una parte de una fase codificadora por una secuencia heteróloga que empieza en el codón de iniciación del gen sustituido con el fin de que la expresión del gen insertado sustituya por completo la expresión del gen sustituido. Esto evita la formación de proteínas de fusión que podría ser indeseable en un animal transgénico no humano.

Según este modo de realización de la invención, el ADN de inserción puede incluir entre las secuencias flanqueadoras una secuencia codificadora heteróloga desprovista de promotor, siendo la secuencia codificadora distinta de un gen que codifica para un agente de selección. El ADN de inserción puede incluir además, corriente abajo de la secuencia codificadora y siempre entre las secuencias flanqueadoras, un gen que codifica para un agente de selección, asociado a un promotor que permite su expresión en la célula diana.

De esta forma, la secuencia codificadora heteróloga puede insertarse detrás de un promotor endógeno que posee las propiedades deseadas, por ejemplo una cierta especificidad de expresión, o clave de transcripción, etc., siendo la selectabilidad de las células transformadas independiente por completo de la expresión de la secuencia codificadora heteróloga. Este tipo de construcción permite, por ejemplo, seleccionar los transformantes aún en el caso de que el gen sustituido por la secuencia codificadora heteróloga no se exprese normalmente en las células diana. Esto resulta particularmente importante en la producción de animales transgénicos no humanos a partir de células E.S. ("Embryonic Stem Cells") no humanas, ya que una proporción importante de los genes permanece inactiva hasta un estado más avanzado de desarrollo del animal. El gen HOXC8 (conocido asimismo con el nombre de Hox-3.1) es un ejemplo de este tipo de gen. Por otra parte, si la secuencia codificadora codifica para una proteína fácilmente detectable, por ejemplo, la  $\beta$ -Gal, puede seguirse el desarrollo de la clave de transcripción del gen endógeno sustituido. El vector pGN es un ejemplo de este tipo de construcción.

Según otro modo de realización de la invención, el ADN de inserción puede incluir una secuencia reguladora extraña. El sitio de inserción y, por consiguiente, las secuencias flanqueadoras, se seleccionan en función del objetivo deseado, a saber, o bien la inserción de la secuencia reguladora extraña para dar un efecto de "doble promotor" con la secuencia reguladora endógena, o bien la sustitución de un promotor endógeno por el promotor extraño. La secuencia codificadora que se encuentra bajo el control de la secuencia reguladora puede ser endógena.

Otra posibilidad sería la inserción dirigida de un ADN extraño que comprende a la vez una secuencia reguladora y una secuencia codificadora. Es posible que la secuencia reguladora sea la que se asocia de modo natural con la secuencia codificadora.

El procedimiento de la invención emplea un vector que contiene dos secuencias "flanqueadoras" a ambos lados del gen extraño. Estas secuencias flanqueadoras tienen por lo menos 150 pares de bases y son preferentemente inferiores a la longitud del gen receptor. Es esencial que estas dos secuencias flanqueadoras sean homólogas con las dos secuencias genómicas que lindan con el sitio de inserción deseado. La secuencia flanqueadora del vector que se encuentra corriente arriba del gen extraño a introducir, es normalmente homóloga con la secuencia genómica situada por el lado del extremo 5' del sitio de inserción. De la misma manera, la secuencia flanqueadora del vector que se encuentra corriente abajo del gen extraño, es normalmente homóloga con la secuencia genómica que está situada en el lado del extremo 3' del sitio de inserción.

Es posible introducir secuencias "intercaladoras" entre una u otra de las secuencias flanqueadoras y el gen extraño, por ejemplo secuencias que permiten la selección de los transformantes, marcadores, secuencias que permiten la clonación del vector, etc.

La posición de dichas secuencias intercaladoras con respecto al gen extraño debe sin embargo ser elegida con el fin

de no impedir la expresión del gen extraño, particularmente de la secuencia extraña de ADN codificadora extraña bajo el control del promotor endógeno, o, inversamente, la secuencia codificadora de ADN endógeno bajo el control de elementos de regulación extraños aportados por la secuencia de inserción.

5 A pesar de la presencia de las secuencias flanqueadoras, que alienta una recombinación homóloga, es posible que algunas integraciones se realicen al azar. Con el fin de comprobar que la inserción dirigida se ha producido bien en el sitio diana y no en otro lugar, se utiliza la técnica de la "Polymerase Chain Reaction" (PCR) ("Reacción en cadena de la polimerasa") (véase Ref. 10) para amplificar la secuencia de ADN del locus en el cual se realiza la inserción o debería haber tenido lugar. De esta manera, sólo son seleccionados los clones transformados tras una  
10 recombinación homóloga.

Las secuencias flanqueadoras del vector se seleccionan evidentemente en función del sitio de inserción deseado para que la recombinación homóloga pueda realizarse. Llegado el caso, las secuencias flanqueadoras pueden comprender secuencias réplicas del promotor endógeno y/o unas modificaciones en las secuencias que preceden al  
15 codón de iniciación para mejorar la tasa de traducción (secuencias corriente arriba) y secuencias réplicas de las secuencias de terminación, especialmente sitios de poliadenilación (secuencias corriente abajo).

El gen de inserción puede ser cualquier gen de interés. Se citarán como ejemplos no limitativos, el gen lacZ (como en el modelo descrito más adelante), los genes que codifican para la interleucina o el interferón, los genes de receptor, por ejemplo del ácido retinoico o beta-3 adrenérgico o de H.I.V., y genes conocidos por tener relación con determinadas enfermedades, por ejemplo la miopatía, etc.

Las células eucariotas transformadas mediante el procedimiento de la invención están incluidas asimismo por la presente solicitud.

25 Según una variante preferida de la invención, las células eucariotas son cepas celulares embrionarias no humanas (véase la Ref. 14 y 15).

Dichas células no son células germinales humanas ni células embrionarias humanas.

30 Efectivamente, una célula E.S. no humana mutada puede ser inyectada en un embrión precoz el cual, después de su reimplantación, podrá nacer bajo forma quimérica no humana. Si la progenie germinal es colonizada por la célula mutada, el animal quimérico transmitirá la mutación a su descendencia. A continuación, se podrán observar los efectos de esta mutación, en estado homocigótico en algunos individuos, en su desarrollo, su comportamiento, su metabolismo, su patología, etc.

La figura 1 muestra el plásmido pGN, que forma parte de la invención.

40 Las figuras 2 a y b muestran las moléculas pGMA y pGMD construidas respectivamente a partir del plásmido pGN en relación al gen HOXC8 (Hox -3.1) Estos plásmidos son plásmidos de mutagénesis. Las dos partes de la fase codificante del gen HOXC8 (Hox-3.1) se representan, en el cromosoma 15, con la secuencia "homeo" en negro. Las secuencias correspondientes de HOXC8 (Hox-3.1) se han clonado en el plásmido pGN.

(A: señal de poliadenilación; Enh/Pro: potenciador-promotor).

45 07 y 08 representan los dos oligonucleótidos utilizados en la PCR.

Las figuras 3 a 6 muestran los plásmidos utilizados en la construcción del pGN.

50 La figura 7 ilustra la detección de recombinación homóloga con la técnica de la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) en células E.S. transfectadas.

La figura 8 (a) y (b) muestra análisis de Southern de clones de individuos positivos (L5 y F2) y células E.S. (C.C.E.).

55 El procedimiento de la invención tiene una aplicación industrial muy amplia y puede variar según la naturaleza del gen extraño introducido, por ejemplo para la producción de animales transgénicos no humanos.

La genética de los mamíferos va a progresar de manera considerable gracias a la posibilidad reciente de mutagenizar específicamente cualquier gen, permitiendo así que se defina mejor su función. Por esta tecnología que hace intervenir recombinación homóloga y células E.S. no humanas, se aportarán informaciones preciosas sobre oncogenes, factores de crecimiento, factores de transcripción, etc., genes que atañen a materias muy actuales de la investigación fundamental o aplicada. Una salida importante para la investigación médica es la posibilidad de reproducir una enfermedad humana cuya determinación genética es conocida (ciertas enfermedades humanas con patología, tal como la miopatía de Duchesne), con el objeto de estudiar mejor los mecanismos e investigar una  
60 terapéutica.  
65

Aplicando el procedimiento de la invención, un gen conocido como responsable de una cierta enfermedad se inserta de manera dirigida en el genoma de una célula E.S no humana. El animal transgénico no humano que se produce a continuación presenta un modelo útil de esta enfermedad.

5 Si es necesario, y como se describió anteriormente, los funcionamientos genéticos normales pueden ser mantenidos sustancialmente, a pesar de la inserción del gen extraño.

10 Otra aplicación del procedimiento de la invención consiste en el marcado genético de animales no humanos. Esta aplicación consiste en insertar un gen de inserción que se detecta fácilmente, por ejemplo el gen lacZ, y que puede por tanto desempeñar el papel de un marcador celular. De esta forma, se facilitan estudios de filiación, por ejemplo, en animales no humanos de concurso y la raza puede continuar.

15 La inserción del gen lacZ como gen de inserción posibilita asimismo estudios de promotor. Gracias a la posibilidad de detectar la actividad  $\beta$ -galactosidasa, la actividad y especificidad de diferentes promotores endógenos pueden ser estudiadas haciendo diana en diferentes sitios en el mismo o distintos tipos de células. Los mismos estudios se podrán efectuar en un organismo entero, durante el desarrollo o en el estado adulto, utilizando las técnicas de animales quiméricos o transgénicos no humanos.

20 Los inventores han constatado de forma sorprendente que la frecuencia de recombinación homóloga no está afectada por la inserción de fragmentos de tamaño importante, por ejemplo el LacZ. Esta observación ha sugerido a los inventores que la técnica de recombinación homóloga se adaptaría bien a la inserción de otros genes heterólogos que son de tamaño importante.

25 La invención prevé asimismo la aplicación del procedimiento de sustitución o de inserción específico para la terapia génica.

30 Gracias a la posibilidad de modificar el genoma de un animal no humano, el procedimiento de la invención puede por tanto utilizarse asimismo como "terapia génica". Las utilizaciones más evidentes consistirían en inactivar los genes de receptores de agentes infecciosos (virus o bacterias) o tóxicos. Si esta mutagénesis resultara letal, sería necesario restablecer la función perdida sin restablecer la sensibilidad a los agentes perjudiciales. Un gen modificado que codifica para tal receptor podría ser reintroducido en la célula mutada, a menos que la modificación pueda ser provocada mediante la recombinación homóloga. Esta modificación del patrimonio genético conferiría al animal no humano una inmunidad contra la enfermedad considerada.

35 Este protocolo puede intervenir también en el cuadro de auto-injerto. Células, enfermas o sanas, que no son ni células germinales humanas ni células embrionarias humanas, tomadas de un paciente, podrían ser cuidadas e inmunizadas, y después ser reimplantadas en el mismo individuo.

40 La técnica de la invención se presta también a los estudios de actividad de productos farmacéuticos que se presume tienen una actividad con respecto a productos de expresión de un gen patológico relacionado con una enfermedad. En este caso, el gen de inserción está constituido por el gen patológico o un fragmento de éste y se administra al animal transgénico no humano el producto farmacéutico a ensayar con el objeto de evaluar su actividad sobre la enfermedad.

45 La invención se ilustrará haciendo referencia al plásmido pGN y a su utilización en la inserción dirigida de un gen extraño (lacZ, que codifica para el enzima  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*) en el genoma de una célula E.S. de ratón. El gen lacZ se escogió debido al hecho de que su expresión puede detectarse fácilmente y es simplemente a título ilustrativo.

50 La fase codificadora del enzima  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* (lacZ; 1-3057) fusionada con una secuencia genómica (7292-3) del gen murino HOXC8 Hox.3-1 (Ref 1), empieza por el codón de iniciación de dicho gen. Efectivamente, la secuencia que precede al codón de iniciación de HOXC8 (Hox-3.1) es idéntica a la secuencia consenso observada en los vertebrados (Ref 2), que permite de este modo una tasa de traducción mejor de la  $\beta$ -galactosidasa en las células de los vertebrados. Al gen lacZ le sigue una señal de poliadenilación, por ejemplo del virus SV 40, como la mayoría de los genes eucariotas, con el fin de estabilizar los ARN mensajeros.

55 La actividad de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, que es funcional en las células eucariotas, puede detectarse de distintas formas. Las células que expresan el gen lacZ toman una coloración azul, después de fijación, en presencia de X-Gal, que es un sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa (Ref. 3). Un nuevo sustrato, el FDG (fluororosceína di- $\beta$ -galactopiranosido), permite detectar y dosificar la actividad  $\beta$ -gal, mientras se conservan las células vivas (Ref. 4). Las células que expresan lacZ acumulan un producto fluorescente y pueden aislarse mediante un clasificador de células o FACS (fluorescence-activated cell sorter, Clasificador de células activadas por fluorescencia).

65 La unidad de transcripción del gen de resistencia a la neomicina proviene en su mayor parte del plásmido pRSV neo (Ref 5). El LTR (long terminal repeat, repetición terminal larga) del virus del sarcoma de Rous proporciona secuencias activadora y promotora muy potentes en numerosas células eucariotas (Ref. 6). Del transposón

bacteriano Tn5, proceden un promotor activo en *E. coli* y la fase que codifica el enzima fosfotransferasa (Ref. 7), al que sigue la señal de poliadenilación del virus SV40. El mismo gen bajo el doble control de los promotores RSV y Tn5 puede conferir a las bacterias la resistencia a la neomicina o a la kanamicina, y a las células eucariotas la resistencia al G418.

Mediante una simple mutación puntual, la unidad B de las secuencias activadoras (enhancer, potenciadoras) de la cepa PyEC F9.1 del virus del Polioma se ha convertido en mucho más activa en distintos tipos de células, y en particular en las células de carcinoma embrionario (EC) (Ref 8). Dos copias de dicho potenciador Py F9.1 se insertaron en tándem en el plásmido pGN, corriente arriba del LTR-RSV, y en la orientación "promotor tardío" de la región reguladora del Polioma.

Con el fin de mejorar la tasa de traducción de la fosfotransferasa, la secuencia que precede al codón de iniciación se ha modificado durante una mutagénesis por oligonucleótido. Así, la secuencia T T C G C A U G se ha convertido en G C A C C A U G, que corresponde mucho mejor a la secuencia consenso de iniciación de la traducción en los vertebrados (Ref. 2).

Las mejoras aportadas a la unidad de transcripción del gen de resistencia a la neomicina se han podido estimar transfecando células cepas embrionarias (ES) de ratón. Con una molaridad igual en plásmido, una construcción con los enhancer F9.1 produjo 7,5x más de clones resistentes al G418 que el pRSV neo y de 2 a 3x más que el pMC1 Neo descrito por Capecchi *et al* (ref. 13). De nuevo, el número de clones aumentó 60x, es decir 450x con relación al pRSV neo, modificando la secuencia de iniciación de la traducción. La recombinación homóloga puede constituir un suceso bastante raro, según las condiciones experimentales que se apliquen (por ejemplo, 1/1.000 para HPRT, ref 13). Un vector que presenta una eficacia de selección elevada resulta, por lo tanto de gran utilidad, tanto más cuanto que las condiciones de electroporación dan lugar principalmente a la integración de una sola copia.

El plásmido pGN contiene, además, un origen de replicación bacteriano del tipo co1E1, pBR322, que permite las clonaciones y las preparaciones en *E. coli*.

Por último, un sitio de clonación múltiple (M.C.S.), sintetizado *in vitro*, que únicamente contiene sitios de corte únicos en pGN, se insertó corriente arriba de lacZ, con el fin de facilitar las utilizaciones de dicho plásmido.

Las secuencias plasmídicas "flanqueadoras" que provocan la recombinación homóloga se añaden a los extremos del plásmido pGN después de la linearización del plásmido corriente arriba de lacZ, por un sitio del MCS (véase figura 2). En este caso, las secuencias flanqueadoras escogidas son homólogas a las secuencias cromosómicas procedentes de HOXC8 (Hox-3.1), que deben posteriormente intervenir en la recombinación homóloga.

La figura 2 sitúa la molécula construida a partir del plásmido pGN con respecto al gen HOXC8 (Hox-3.1). En este caso, una recombinación entre las secuencias plasmídicas y cromosómicas de HOXC8 (Hox-3.1) llevaría a una inserción al principio de la fase codificante de dicho gen y, por lo tanto, a su inactivación total.

El plásmido pGN reúne varias ventajas para esta metodología, que es aplicable a cualquier gen. Pudiendo ser bastante raro el suceso de la recombinación homóloga, (del orden de 1 por 1000 integraciones no homólogas), es necesario poder analizar muchos clones cuya resistencia al G418 sea suficientemente intensa como para que se exprese en cualquier parte del genoma. Las modificaciones aportadas a la unidad de transcripción de la fosfotransferasa responden perfectamente a estos problemas. El método de mutagénesis por recombinación homóloga equivale a inactivar un gen por una inserción o una sustitución, pero el plásmido pGN presenta la ventaja suplementaria de poder sustituir la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa por la del gen mutado. Por último, el MCS facilita las clonaciones de fragmentos genómicos.

## Ejemplos

### I- Construcción del plásmido pGN.

Los plásmidos intermediarios se numeran según su etapa.

#### 1ª etapa:

Inserción de un sitio Xho I en el sitio Bgl I de pRSV neo.

Inserción de un engarce Xho I en el sitio Bgl I de pRSV neo, satisfecha por el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli*.

#### 2ª etapa:

Inserción de un sitio Cla I en el sitio Nde I del plásmido p1.

## ES 2 381 039 T3

Inserción de un engarce Cla I en el sitio Nde I de p1, satisfecha por la polimerasa Klenow.

### 3ª etapa:

5 Inserción de un potenciador Py F9.1 en el sitio Cla I del plásmido p2.

Inserción de un potenciador Py F9.1 Pvu II-Pvu II aislado por un sitio único, Acc I, en el sitio Cla I de p2. Selección de un clon que contenga dos potenciadores orientado en el sentido "promotor tardío".

10 4ª etapa:

Delección Sma I-Hpa I del plásmido p3.

15 Los dos enzimas, que dan lugar a "extremos libres", pueden ser unidos directamente. Esta delección elimina el intrón del antígeno t de SV 40, que no es muy útil, y disminuye de forma apreciable el tamaño de la unidad de transcripción de la fosfotransferasa.

### 5ª etapa:

20 Inserción de un sitio Xho I en el sitio Bam HI de pCH110.

Inserción de un engarce Xho I en el sitio Bam HI del plásmido pCH 110 (Pharmacia), satisfecha por la polimerasa Klenow.

25 6ª etapa:

Inserción del 3' lacZ-poliA SV 40 en el plásmido p4.

30 La región 3' de la fase codificadora de la β-galactosidasa, seguida por la señal de poliadenilación del virus SV 40 se aísla del plásmido p5 por los sitios Xho I-Aat II y se clona en el plásmido p4 por los mismos sitios.

### 7ª etapa:

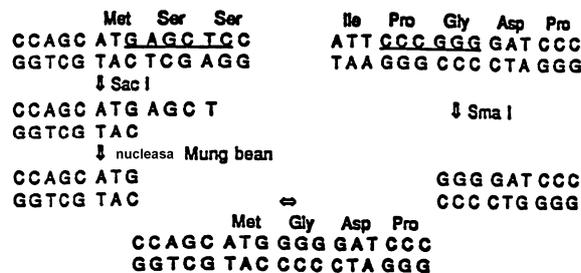
35 Inserción del 5' lacZ en el vector KS-

La región 5' de la fase codificadora de la β-galactosidasa se aísla del plásmido pMC 1871 (Pharmacia) por los sitios Pst I-Sac I y se clona en el vector KS- (Stratagene) por los mismos sitios.

### 8ª etapa:

40 Fusión de una secuencia genómica HOXC8 (Hox-3.1) con el 5' lacZ

45 Una secuencia genómica del gen HOXC8 (Hox-3.1), clonada en el vector KS-, se purifica por digestiones sucesivas mediante el enzima Sac I, y a continuación por la nucleasa Mung bean y, por último, por el enzima Apa I. Esta inserción se fusiona con la parte 5' de la fase codificadora de la β-galactosidasa mediante clonación en el plásmido p7 digerida por Apa I-Sma I. La proteína fusionada de este modo contiene el codón de iniciación de la traducción del gen HOXC8 (Hox-3.1), seguido de la fase codificadora de la β-galactosidasa (comprobada a continuación mediante secuenciación).



50

### 9ª etapa:

55 Inserción de HOXC8 (Hox-3.1)-5' lacZ en el plásmido p6.

La fusión HOXC8 (Hox-3.1)-5' lacZ se aísla del plásmido p8 por los sitios Apa I-Sac I y se clona en el plásmido p6 por los mismos sitios. Esta clonación tiene por efecto reconstituir la fase codificadora de la β-galactosidasa en su

totalidad.

10ª etapa:

5 Inserción del gen Neo<sup>R</sup> en el vector KS+

El gen de resistencia a la neomicina (promotor bacteriano y fase codificadora de la fosfotransferasa) se aísla del pRSV neo por los sitios Hind III-Eco RI y se clona en el vector KS+ (Stratagene).

10 11ª etapa:

Mutagénesis de la secuencia de iniciación de Neo<sup>R</sup> en p10.

15 La secuencia de iniciación de la traducción de la fosfotransferasa es modificada para que sea idéntica a la secuencia consenso observada en los vertebrados y permitir de esta forma una tasa superior de iniciación de la traducción y, por lo tanto una resistencia acrecentada al G418 para las células de mamíferos. La modificación crea de igual modo un sitio Apa LI que permite controlar la eficacia de la mutagénesis.



20 Se sintetiza un oligonucleótido (Gene Assembler, Pharmacia) (CTTGTTCAATCATGGTGCACGATCCTCA) que comprende una región de desapareamiento con la secuencia del pRSV neo (subrayada) y se fosforila seguidamente por la polinucleótido quinasa del bacteriófago T4. Se prepara una matriz monocatenaria del plásmido p10 gracias al origen f1 del plásmido KS+ y se hibridiza con el oligonucleótido de mutagénesis. La segunda hebra se sintetiza y repara por la polimerasa Klenow y la ADN ligasa del bacteriófago T4. Después de la transformación de las bacterias, los clones mutados se localizan mediante el oligonucleótido marcado con <sup>32</sup>P. La mutagénesis se ha comprobado digiriendo mediante Apa LI, así como mediante secuenciación.

30 12ª etapa:

Sustitución de la secuencia de iniciación en el plásmido p9.

35 Un fragmento que contiene la secuencia modificada de iniciación de la traducción del gen de resistencia a la neomicina, se aísla del plásmido p11 por los enzimas Hind III-EagI y se clona en el plásmido p9 por los mismos sitios.

13ª etapa:

40 Inserción del sitio de clonación múltiple en el plásmido p12.

Se sintetizan dos oligonucleótidos complementarios (Gene Assembler, Pharmacia), y después se fosforilan. Después de apareamiento, el MCS se clona en los sitios Apa I-Sac II del plásmido p12, gracias a sus extremos cohesivos.



45 El sitio de clonación múltiple se ha comprobado asimismo mediante secuenciación.

50 II - Adición de las secuencias "flanqueadoras" en los extremos del plásmido pGN linearizado corriente arriba de lacZ' por un sitio del M.C.S.

Las secuencias flanqueadoras que se utilizan se han seleccionado en función del sitio de inserción deseado (por ejemplo, HOXC8 (Hox-3.1), véase figura 2 a y b pGMA y pGMD).

55 En la construcción del plásmido de mutagénesis pGMD, se han clonado dos brazos del ADN homólogo en el locus HOXC8 (Hox-3.1), en los sitios Apa I-Nsi I y Nsi I-Sac II del vector pGN. El brazo 5' empieza en el sitio Sac II (CCGCGG) en el nucleótido 219 del ADNc c21 de HOXC8 (Hox-3.1). Este fragmento abarca 6,8 kb en 5' hasta el primer sitio BamHI. El brazo 3' empieza en el sitio Apa I (GGGCCC) en el nucleótido 885 del ADNc c21. Este fragmento abarca 1,5 kb en 3' hasta el primer sitio PstI. Se ha insertado un engarce NsiI en el sitio BamHI del

fragmento 5' y en el sitio PstI del fragmento 3'. Los brazos 5' y 3' se han clonado en el vector pGN en los sitios Nsi I-Sac II y Apa I-Nsi I, respectivamente. Se ha publicado la secuencia del ADNc de HOXC8 (Hox-3.1) c21 (ref 1).

5 El plásmido de mutagénesis se lineariza mediante digestión con Nsi I antes de electroporación de células E.S. Sus extremos están formados por los dos brazos genómicos clonados en los sitios Apa I-Nsi I y Nsi I-Sac II del vector pGN.

10 El plásmido pGMD no presenta señal de poliadenilación después del gen de resistencia pero, en cambio, presenta una secuencia rica en AU responsable de una degradación selectiva de ARNm, insertada en la secuencia del intrón de HOXC8 (Hox-3.1) del plásmido.

15 Otro plásmido de mutagénesis, pGMA, presenta idéntica estructura que el pGMD pero contiene las señales de poliadenilación y de terminación de transcripción del SV40 y no presenta la secuencia AU de degradación de ARNm corriente abajo del gen Neo<sup>r</sup>. Estas modificaciones tenían como objetivo reducir la proporción de transcritos de Neo<sup>r</sup> en clones procedentes de la integración al azar. Por el contrario, clones procedentes de episodios de recombinación homóloga entre pGMD y un locus HOXC8 (Hox-3.1), deberían tener un crecimiento inalterado durante la selección con G418, eliminándose la secuencia AT de degradación de ARNm por el mismo procedimiento de recombinación, o empalmándose con el intrón HOXC8 (Hox-3.1).

20 En las etapas experimentales que siguen, se ha seguido el protocolo descrito por Thompson *et al.* 1989 para la producción de animales quiméricos.

### III - Transfección de células embrionarias de ratón.

25 El método descrito por Thompson *et al.* 1989, se ha utilizado para transfectar células embrionarias de ratón. La utilización de la técnica de electroporación asegura la introducción de una sola copia del gen extraño (lacZ) por célula. Después de transfección, se han aislado varios clones que expresan la  $\beta$ -galactosidasa.

30 Los plásmidos de mutagénesis pGMD y pGMA se han linearizado e introducido mediante electroporación en células E.S. con el fin de favorecer la inserción sólo de una copia en el genoma (ref 11).

Las transfecciones iniciales se han realizado para comparar la eficacia de localización del HOXC8 (Hox-3.1) de los plásmidos pGMA y pGMD (véase tabla I).

35 TABLA I

Exp.	Plásmido de mutagénesis	Nº del conjunto analizado	Recombinación homóloga en el gen HOXC8 (Hox-3.1)	
			Nº de clones que forman el conjunto	Nº de resultados PCR positivos
I	pGMA	3	600	0(2)
II	pGMD	5	250	3(5)
III	pGMD	84	2-3	5(5)

40 La progenie celular E.S. "C.C.E." (ref 16) se ha mantenido de una forma continua sobre cepas nutrientes fibroblásticas (ref 17). Para los experimentos I y II, se sometieron a electroporación  $1,5 \times 10^7$  células E.S. en 1,5 ml de HeBS (ref 11) a 200 V, con 40 mg de plásmido linearizado, y seguidamente distribuidas en cuatro cajas de cultivo (diámetro de 100 mm). Para el experimento III, el choque se ha llevado a cabo en las mismas condiciones pero una cuarta parte de las células se han distribuido en cuatro placas de 24 pocillos. Al día siguiente, se añadieron  $250 \mu\text{g ml}^{-1}$  de G418. Cada transfección dio lugar a aproximadamente 2.400 clones con pGMA y a aproximadamente 1.000 clones con pGMD.

45 El número medio de clones de células E.S. resistentes al G418 en cada conjunto se indica en la tabla I, así como el número de conjuntos que dan un resultado positivo con la técnica PCR. Un resultado positivo significa que se ha podido observar una banda de 1,6 Kb en un gel de agarosa coloreado con bromuro de etidio (véase figura 7). Se indica entre paréntesis (figura 8) el número de conjuntos que dan una señal positiva después de un análisis Southern de la mezcla PCR y de hibridación de una sonda específica que no contenía las secuencias de los iniciadores.

### Detección de la recombinación homóloga con la PCR

55 Se llevó a cabo la PCR sobre  $10^5$  células de un conjunto de 250 clones de la transfección II (véase vía D de la figura 7). En las otras vías, se analizaron a la vez cuatro conjuntos de la transfección III mezclando aproximadamente 4 x 5.000 células. Los iniciadores 07 y 08 utilizados en la PCR rodean la secuencia 3' HOXC8 (Hox-3.1) del plásmido de mutagénesis (figura 2). El fragmento de 1,6 Kb que abarca esta secuencia 3' únicamente puede amplificarse en el caso de una recombinación homóloga. Las vías 2, 3 y D ilustran resultados positivos.

60

El ADN de los clones E.S. se preparó en el momento de la réplica sobre filtro, utilizando el método "boiling-proteinase K digestion boiling" (ref 18). Se llevaron a cabo 40 ciclos de amplificación (40 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C, 7 minutos a 72°C), en una mezcla de reacción de 100µl, que contenía 67 mM Tris-HCL (pH 8,6), 16,7 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6,7 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de 2-mercaptoetanol, gelatina al 0,01% (p/v), 200 µM dATP, dTTP y dCTP, 100 µM dGTP, 100 µM 7-deaza dGT, 600 ng de cada iniciador (07: AACTTCCCTCTCTGCTATTC y 08 : CAGCAGAAACATACAAGCTG) y 3U de polimerasa Taq (Perkin Elmer Cetus), cubierto con 100 µl de parafina. La mitad de la mezcla de reacción se aplicó a un gel de agarosa al 0,7% coloreado con bromuro de etidio. El marcador de tamaño es un digerido Eco RI + Hind III de ADN lambda.

#### 10 Análisis de Southern

Se aislaron a partir de los conjuntos positivos, utilizando pipetas, tres clones independientes de células E.S. que contenían el HOXC8 (Hox-3.1) mutado (identificado por PCR). Se examinó su ADN mediante análisis de Southern después de digestión con los enzimas de restricción indicados en la figura 8, con el fin de confirmar la localización específica y de hacer la distinción entre los loci recombinados y salvajes. Se utilizaron dos sondas diferentes en el análisis del extremo 3' de los loci HOXC8 (Hox-3.1) en los clones mutados y en las células E.S. no mutadas que actuaban como testigos (figura 8 c). La primera sonda "a" estaba contenida en las secuencias HOXC8 (Hox-3.1) del plásmido de mutagénesis y demostraba el número de integraciones de vector y sus enlaces físicos. Uno de los tres clones recombinados contenía además una copia del plásmido integrada al azar (fig. 8a, clon F<sub>2</sub>). La segunda sonda "b" que no estaba contenida en el vector de mutagénesis distinguía entre los alelos HOXC8 (Hox-3.1) recombinados y salvajes (fig. 8 b). El locus recombinado HOXC8 (Hox-3.1) presentaba, con las dos sondas, la imagen de hibridación esperada a partir de los mapas de restricción del vector de mutagénesis y del locus intacto. Además, se confirmó la existencia de dos dominios de recombinación en el brazo 3' del vector por la presencia o ausencia de la secuencia AT en el locus HOXC8 (Hox-3.1) recombinado (por ejemplo, fig. 8, clon L5). El extremo 5' del locus HOXC8 (Hox-3.1) se analizó asimismo para el episodio de recombinación homóloga. Se utilizaron enzimas de restricción que no presentaban sitios en la secuencia HOXC8 (Hox-3.1) 5' de 6,8 Kb del vector de mutagénesis, en la digestión de los ADN de los clones recombinados. Estos ADN se sometieron seguidamente a una electroforesis en un campo sometido a pulsos para diferenciar los fragmentos de peso molecular elevado. Un análisis de Southern de este gel indicó asimismo los alelos recombinados correctamente y los alelos HOXC8 (Hox-3.1) salvajes, utilizando una sonda que presentaba una secuencia corriente arriba del plásmido de mutagénesis.

Los análisis de Southern demostraron que un alelo del gen HOXC8 (Hox-3.1) se recombinó tal como estaba previsto. La recombinación homóloga era equivalente a un doble "crossing-over" (entrecruzamiento) entre los brazos genómicos del plásmido de mutagénesis y las secuencias cromosómicas homólogas (figura 2).

En los clones recombinantes, el gen lacZ se puso bajo el control de las secuencias promotoras y reguladoras del Hox -3.1, corriente arriba del codón AUG, pero las señales 3' de maduración del ARNm procedían del SV40. En estos clones recombinados, la expresión de lacZ no se podía detectar mediante coloración con β-Gal, lo que es coherente con la ausencia de transcripción de HOXC8 (Hox-3.1) en las células E.S. determinada mediante análisis de protección de ARNasa. La actividad de β-Gal se podía inducir en ciertas células después de 3 ó 4 días de cultivo en presencia de 5.10<sup>-7</sup> M de ácido retinoico, condiciones que se sabe son inductoras de la transcripción de HOXC8 (Hox-3.1) (ref 19).

Utilizando el vector de mutagénesis pGMA, que presenta una homología total de 8,3 Kb de ADN con el locus HOXC8 (Hox-3.1), se sustituyó un fragmento de 120 pares de bases por una inserción de 7,2 Kb. La frecuencia de esta sustitución localizada (1/900) es comparable a la obtenida recientemente (1/1000) con HPRT (ref 13) o con En-2 (1/260) (ref 20), siendo sin embargo en estos últimos casos el fragmento heterólogo insertado de un tamaño mucho menos importante (1,1 y 1,5 Kb respectivamente). Sorprendentemente, se constató que con el vector pGMD se pudo obtener una frecuencia de recombinación homóloga muy elevada (1/40). La eliminación de las señales 3' de maduración del ARNm y la adición de la secuencia de degradación del ARNm al gen de resistencia a la neomicina, ha tenido como consecuencia reducir por 2,4 el número total de clones resistentes al G418 (tabla I). La relación de localización específica era casi 10 veces más elevada (900/40). En los experimentos con pGMD, se ha debido afectar incluso el mecanismo de recombinación homólogo. Una explicación posible de estos resultados sería que una secuencia AT de 51 pares de bases podría proporcionar, *in vivo*, un bucle abierto en el plásmido de mutagénesis a causa de su temperatura de fusión más baja. Si las secuencias HOXC8 (Hox-3.1) vecinas del pGMD pueden verse influenciadas por esta apertura, a cada lado de la región AT, podrían reaccionar de una manera más eficaz, en estado monocatenario, con el locus cromosómico HOXC8 (Hox-3.1). El modelo de recombinación mitótica en la levadura sugiere que se iniciaría por un intercambio de hebras de este tipo, aunque el mecanismo de recombinación homólogo permanece desconocido en los eucariotas más complejos.

La figura 8 muestra los resultados del análisis de Southern efectuado en clones de individuos positivos (L5 y F2) y en células E.S. (C.C.E.).

Las sondas utilizadas únicamente se hibridan con las secuencias HOXC8 (Hox-3.1) incluidas en el vector (a) o excluidas del vector de mutagénesis (b). La imagen de hibridación del locus HOXC8 (Hox-3.1) recombinado (triángulos abiertos) se distingue claramente del locus salvaje (triángulos negros). Los asteriscos indican las bandas

de hibridación de una copia del plásmido que se ha integrado al azar. El marcador de tamaño es un digesto Eco RI + Hind III de ADN lambda.

La figura 8 (c) muestra los mapas de restricción de los alelos HOXC8 (Hox-3.1) recombinados (rec) y salvajes (wt). Las partes del vector de mutagénesis y del locus HOXC8 (Hox-3.1) se indican con los mismos símbolos que los utilizados en la figura 2. En este caso, la secuencia AT se ha integrado mediante recombinación homóloga. La flecha vertical indica el extremo 3' del plásmido de mutagénesis. La localización de las sondas "a" y "b" utilizadas en el análisis de Southern, se indica también. Las abreviaturas utilizadas en la figura 8 son las siguientes: B, Bam HI; D, Dra I, E, Eco RI; H, HlnI III; S, Sal I; X, Xho I

#### IV - Producción de embriones quiméricos no humanos

Se realizó una microinyección en unos blastocistos con dos clones E.S. recombinantes que contenían un alelo HOXC8 (Hox-3.1) intacto y un alelo recombinado, no conteniendo estos clones ninguna otra copia del plásmido de mutagénesis. Los cariotipos de estas células eran normales.

Se microinyectaron de diez a quince células mutadas por blastocisto. Tras reimplantación en las madres portadoras, se recuperaron los embriones a los 9,5, 10,5 y 12,5 días después de la conjugación, y se analizaron para la expresión de lacZ. La clave de transcripción de HOXC8 (Hox-3.1) en estos estadios se había determinado previamente mediante análisis de hibridación *in situ* (ref 1). Los transcritos HOXC8 (Hox-3.1) son detectables la primera vez en el estadio de gastrulación tardía y se reparten en todos los tejidos de la parte posterior del animal. Más tarde, el reparto se limita progresivamente en el espacio y se hace específico del tejido. En el estadio de 12,5 días después de la conjugación, la transcripción se localiza en la región cervical del tubo neural, a nivel del corazón. Durante la embriogénesis, el reparto de la transcripción de HOXC8 (Hox-3.1) sufre, por tanto, modificaciones. El estadio de 10,5 días después de la conjugación parece ser un período de transición, teniendo lugar la transcripción a la vez en las dos regiones posteriores y en el tubo neural cervical.

En embriones quiméricos de 9,5 y 10,5 días post conjugación, la parte caudal en la yema posterior presentaba una actividad  $\beta$ -Gal intensa, mientras que el marcador no se ha detectado nunca en la región torácica anterior o en la cabeza (figura 9a). En la región posterior, se han observado células coloreadas por  $\beta$ -Gal en todos los tejidos y de todas las capas embrionarias. Entre las dos yemas que dan lugar a los miembros, se repartían células coloreadas en zonas restringidas, en el ectodermo superficial (figura 9b), así como en las regiones posteriores (figura 9c) y, en forma de líneas estrechas o estrías, en el tubo neural (figura 9 b). Estas estrías presentaban un reparto irregular y asimétrico en la pared del tubo neural. La transcripción de HOXC8 (Hox-3.1) no se detectó en la capa delgada de células hacia el cierre del tubo neural. Estas células no han resistido quizás a los tratamientos aplicados al realizar la hibridación *in situ*. Se ha observado que las células del ectodermo neural forman parte, muy temprano, de partes distintas del sistema nervioso y se desplazan en una dirección radial, según unos movimientos laterales estrechos (ref 21). Estos resultados son por tanto coherentes con esta observación.

La expresión de LacZ ha ilustrado por tanto correctamente la primera parte de la transcripción del homeogen HOXC8 (Hox-3.1), es decir, en todos los tejidos de las regiones caudales de los embriones de 9,5 y 10,5 días post conjugación, y ha proporcionado nuevas informaciones con respecto al modo de transcripción de HOXC8 (Hox-3.1).

Por el contrario, la expresión de LacZ no se ha observado en las regiones cervicales del tubo neural de embriones quiméricos de 12,5 días, ni en la región anterior de embriones de 10,5 días; esto no constituía el resultado esperado a partir de los estudios de hibridación *in situ*. La fase ulterior de transcripción de HOXC8 (Hox-3.1) observada a partir del día 10,5 en las zonas muy localizadas del tubo neural no se evidenciaba por la actividad de  $\beta$ -Gal. Una explicación posible de este resultado sería que, aunque la expresión del LacZ esté bajo el control del promotor HOXC8 (Hox-3.1), las secuencias 3' del HOXC8 (Hox-3.1) están ausentes en el gen reportador. Es posible que las secuencias 3' del codón de iniciación AUG del HOXC8 (Hox-3.1) tengan influencia en la expresión tardía de HOXC8 (Hox-3.1) en el dominio anterior. Un efecto de "dosificación génica" podría también explicar este resultado. La autoactivación de varios homeogenes en *Drosophila* se ha demostrado genéticamente o se ha sugerido por la formación de complejos entre el ADN y las proteínas de las homeosecuencias.

Si el componente tardío de la transcripción de HOXC8 (Hox-3.1) en el tubo neural se mantiene mediante un mecanismo parecido, la inactivación de un alelo podría tener un efecto dominante en las células del ectodermo neural. Ya que un alelo sólo produciría la proteína HOXC8 (Hox-3.1), la señal de activación se diluiría sobre los dos promotores. La reducción de la autoinactivación en los dos loci podría conducir de este modo a una detención total de la iniciación de la transcripción. Esto podría explicar porqué no se ha detectado ninguna expresión de LacZ en la región cervical del tubo neural de embriones de 10,5 y 12,5 días.

#### V - Paso de la modificación a la progenie celular germinal: producción de animales transgénicos no humanos

Los efectos en F<sub>1</sub> y en F<sub>2</sub> de la modificación aportada por la inserción dirigida se han observado después de reproducción de las quimeras. Se ha constatado el paso de la modificación a la progenie celular germinal.

**Bibliografia**

1. Le Mouellic, H., Condamine, H. y Brûlet, P. (1988). *Genes & Development*. 2, 125-135.
- 5 2. Cavenir, D.R. (1987). *Nucleic Acids Res.* 15, 1353-1361.
3. Sanes, J.R. Rubenstein, J.L.R. y Nicolas, J.F. (1986) *EMBO J.* 5, 3133-3142.
4. Nolan, G.P., Fiering, S., Nicolas, J.F. y Herzenberg, L.A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2603-2607.
- 10 5. Gorman, C., Padmanabhan, R. y Howard, B.H. (1983). *Science*. 221, 661-553.
6. Gorman, C.M., Merlino, G.T. Willingham, M.C. Pastan, I. y Howard, B. H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6777-6781.
- 15 7. Southern, P.J. y Berg, P. (1982) *J. Mol. Appl. Genet* 1, 327- 341.
8. Herbomel, P., Bourachot, B. y Yaniv, M. (1984). *Cell*. 39, 653-662.
- 20 9. Robertson, E.J. (1987). *Teratocarcinomas and embruonic stem cells: A practical approach*. IRL Press, Oxford.
10. Kahn, A. (1988). *Médecine/Sciences* 4, 515-518.
11. G. Chu, Hayakawa H., Berg. P. (1987) *Nucleic Acid Research* 15, Nr. 3, 1311-1326.
- 25 12. Thompson, S., Clarke, A.R., Pow, A.M., Hooper, M.L., Melton, D.W., (1989) *Cell*, 56, 313-321.
13. Thomas, K.R., Capecchi, M.R., (1987) *Cell*, 51 503-512.
- 30 14. Evans, M.J., Kaufmann, M.H. (1981) *Nature*, 292, 154-155,
15. Robertson, E.J., (1986) *Trends in Genetics*, 9-13
- 35 16. Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M. & Evans, M. *Nature* 323, 445-448 (1986).
17. Robertson, E.J. in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells* (ed. Robertson, E.J.) 71-112 (IRL, Oxford, 1987).
- 40 18. Kim, H.S. & Smithies, O. *Nucleic Acids Res.* 16, 8887-8903 (1988).
19. Breier, G., Bucan, M., Francke, U., Colberg-Poley, A.M. & Gruss, P. *EMBO J.*5, 2209-2215 (1986).
20. Joyner, A.L., Skarnes, W.C. & Rossant, J. *Nature* 338, 153-156 (1989).
- 45 21. McKay, R. D. G. *Cell* 58, 815-821 (1989).
22. Doetschman, T. Maeda, N. & Smithies O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8583-8587 (1988).
- 50 23. Doetschman, T. Gregg R., Maeda N. Hooper M., Melton D., Thompson S. & Smithies O. *Nature* 330, 576-578 (1987).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento de sustitución de un gen, mediante administración dirigida de un ADN, denominado ADN de inserción, constituido por una parte de un gen, susceptible de volverse funcional o más eficaz cuando se recombina con un ADN de complemento para proporcionar entonces un gen recombinante completo en el genoma de una célula eucariota, comprendiendo dicho procedimiento:
- 10 - la introducción en unas células eucariotas que no son ni células germinales humanas, ni células embrionarias humanas, de un vector que contiene una inserción que comprende a su vez el ADN de inserción, y dos secuencias denominadas "flanqueantes" a ambos lados del ADN de inserción, respectivamente homólogas a dos secuencias genómicas que lindan con el sitio de inserción deseado en un gen seleccionado, denominado gen receptor y que contiene el ADN de complemento;
- 15 - comprendiendo el ADN de inserción una parte de un gen, y siendo heterólogo con respecto al gen receptor;
- siendo las secuencias flanqueantes seleccionadas para permitir por recombinación homóloga, la expresión del ADN de inserción bajo el control de secuencias reguladoras del gen endógeno en el que se realiza la inserción;
- 20 - no codificando dicho gen recombinante para un producto de expresión que permite la selección de los transformantes.
- 25 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el ADN de inserción comprende una secuencia codificadora y una secuencia reguladora.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el gen receptor es un gen que normalmente no está transcrito en la célula eucariota.
- 30 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el gen receptor no presenta ningún fenotipo para seleccionar.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el ADN de inserción sustituye una parte de la fase codificadora del gen receptor.
- 35 6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las secuencias flanqueadoras son de tamaño importante, preferentemente inferior a la longitud del gen receptor.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el gen de inserción es un gen que codifica para un receptor.
- 40 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el vector comprende unas secuencias intercaladas entre el ADN de inserción y las secuencias flanqueadoras, por ejemplo unas secuencias que permiten la clonación de un vector.
- 45 9. Célula eucariota recombinada, capaz de expresar un gen o una parte de un gen, siendo dicha célula susceptible de ser producida según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 50 10. Procedimiento de producción de animales transgénicos no humanos, que comprende la realización de un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la inserción del ADN de inserción se lleva a cabo en un huevo no humano en el estado unicelular.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dichos animales son mamíferos.
- 55 12. Animal transgénico no humano susceptible de ser obtenido mediante un procedimiento según la reivindicación 10.
13. Animal según la reivindicación 12, en el que dicho animal es un ratón.
14. Animal según la reivindicación 12, en el que el gen receptor permanece inactivo hasta un estadio más avanzado del desarrollo del animal.

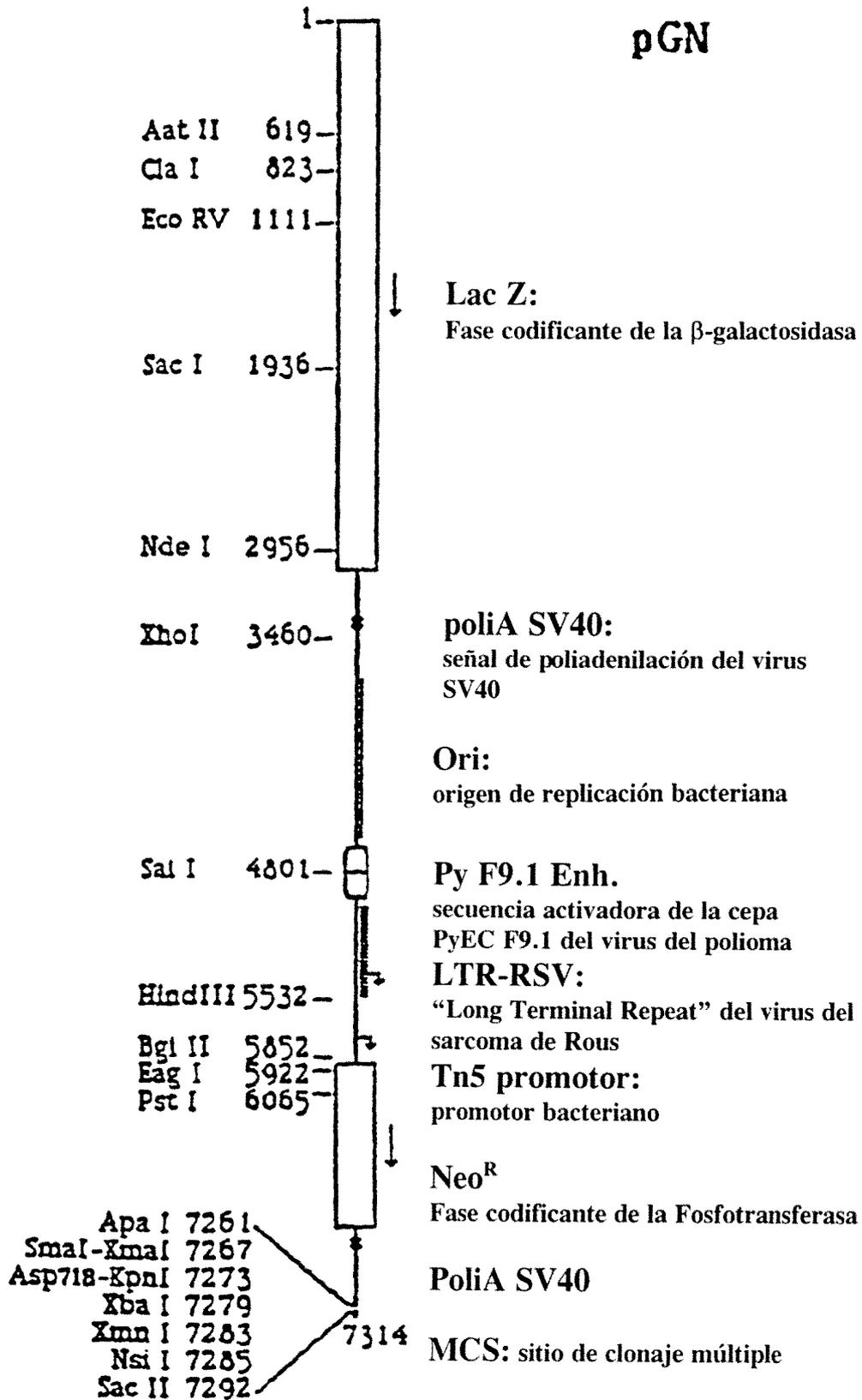


Figura 1: plasmido lineal

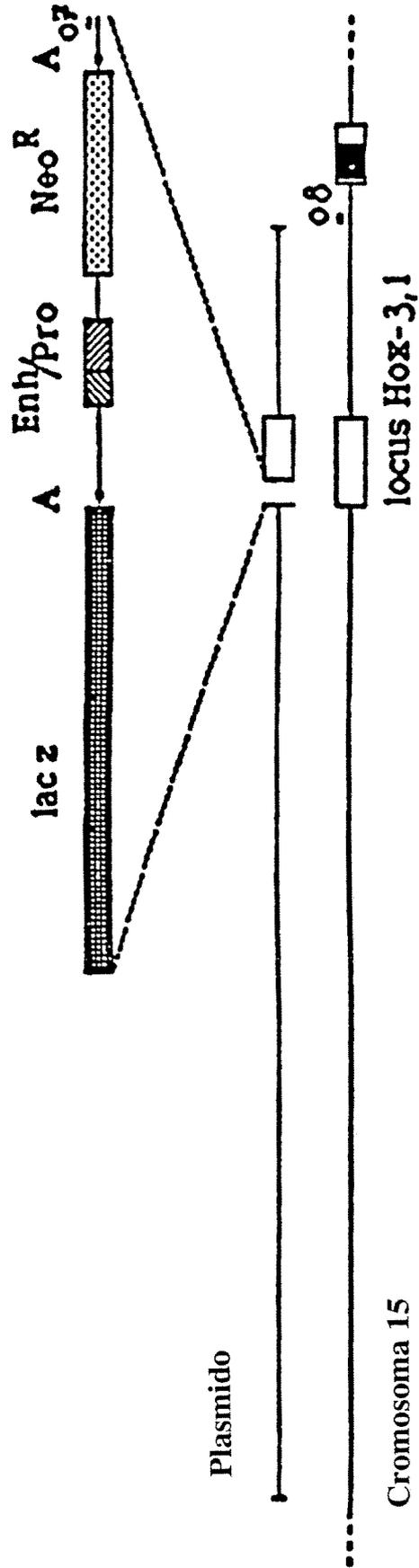


FIGURA 2a

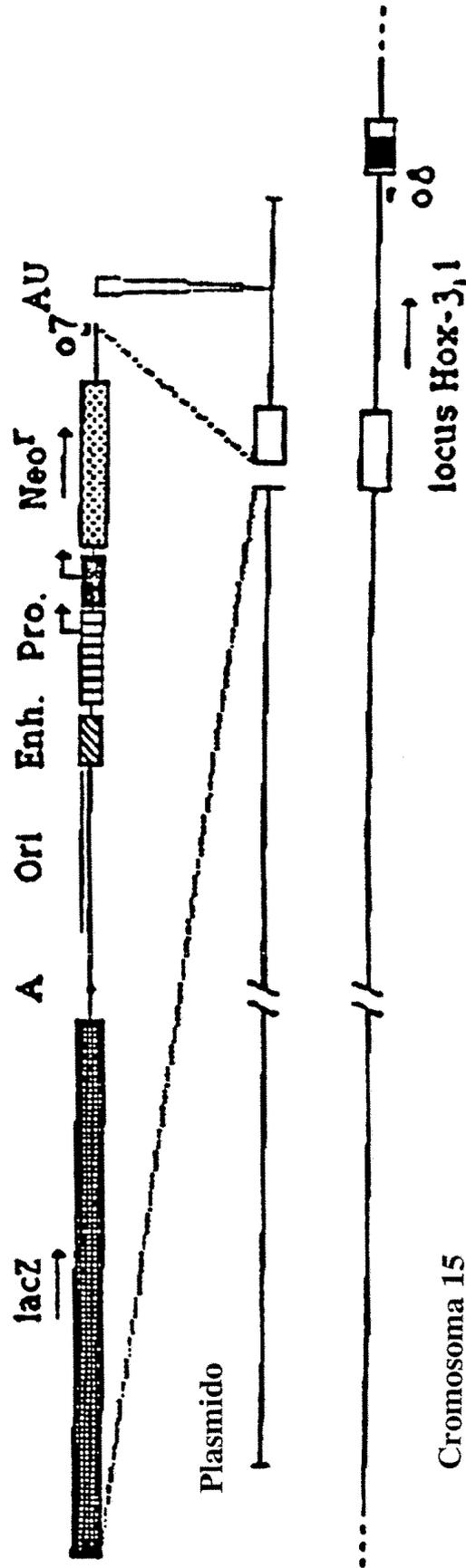


FIGURA 2b

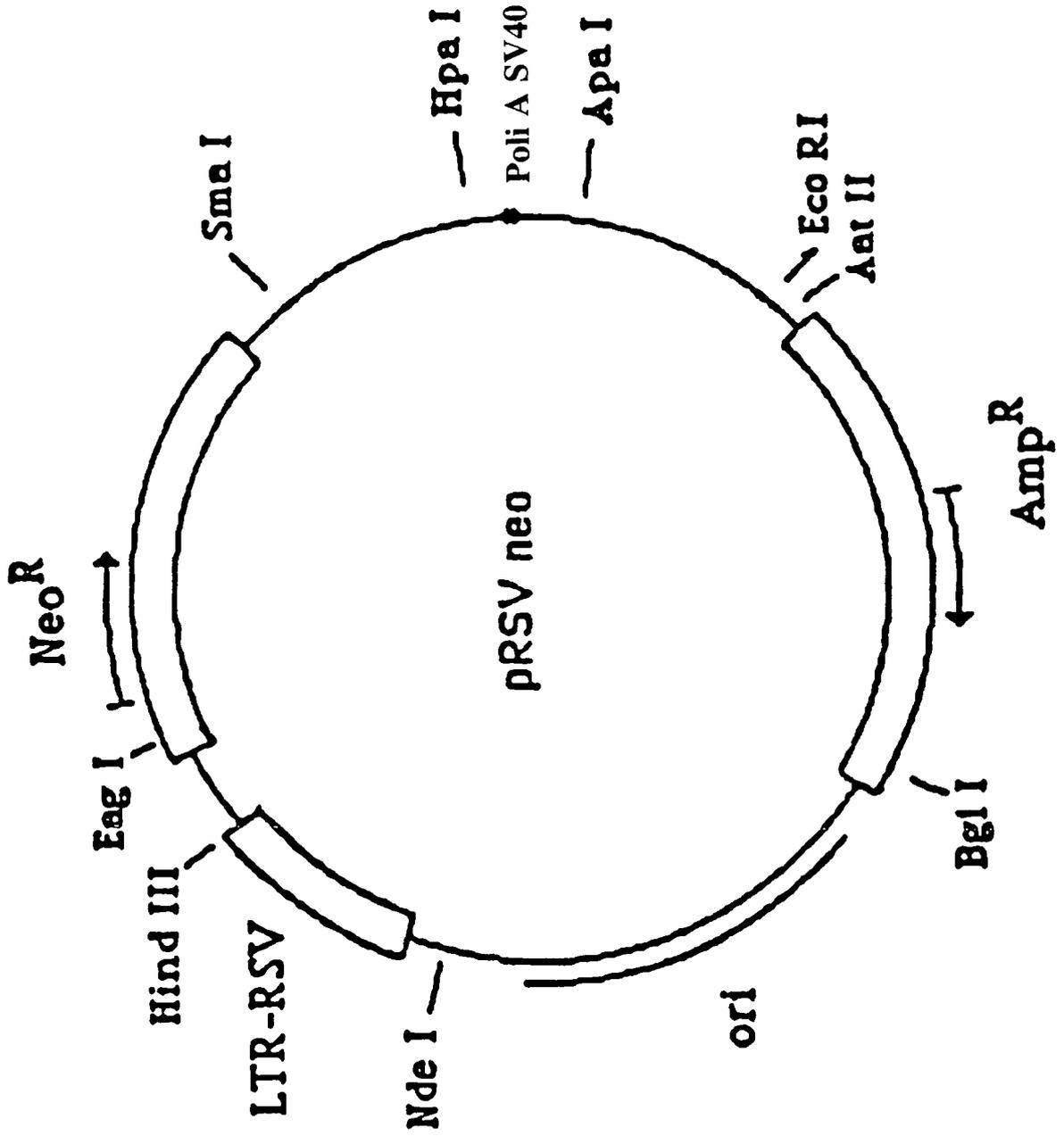
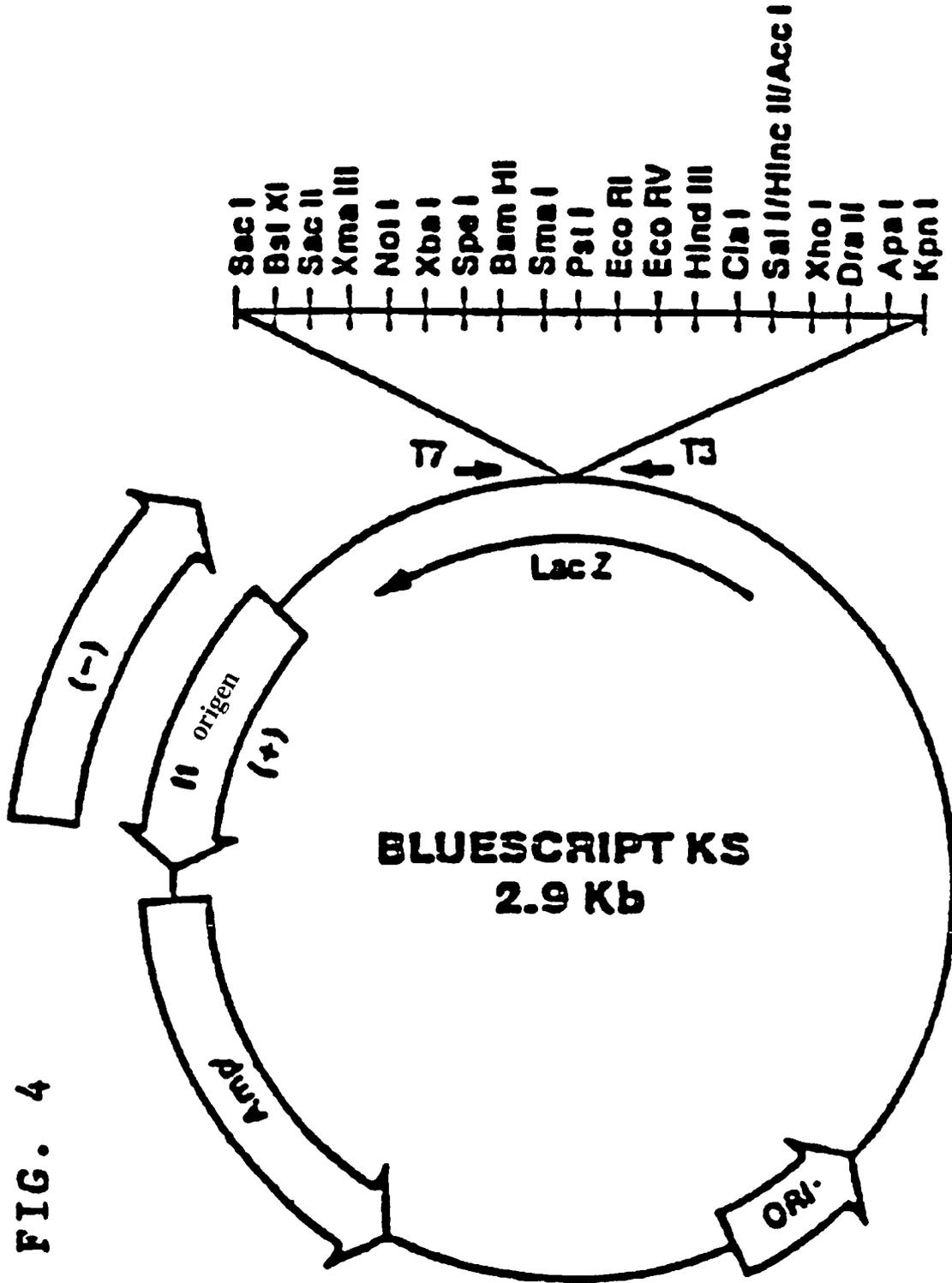


FIG. 3



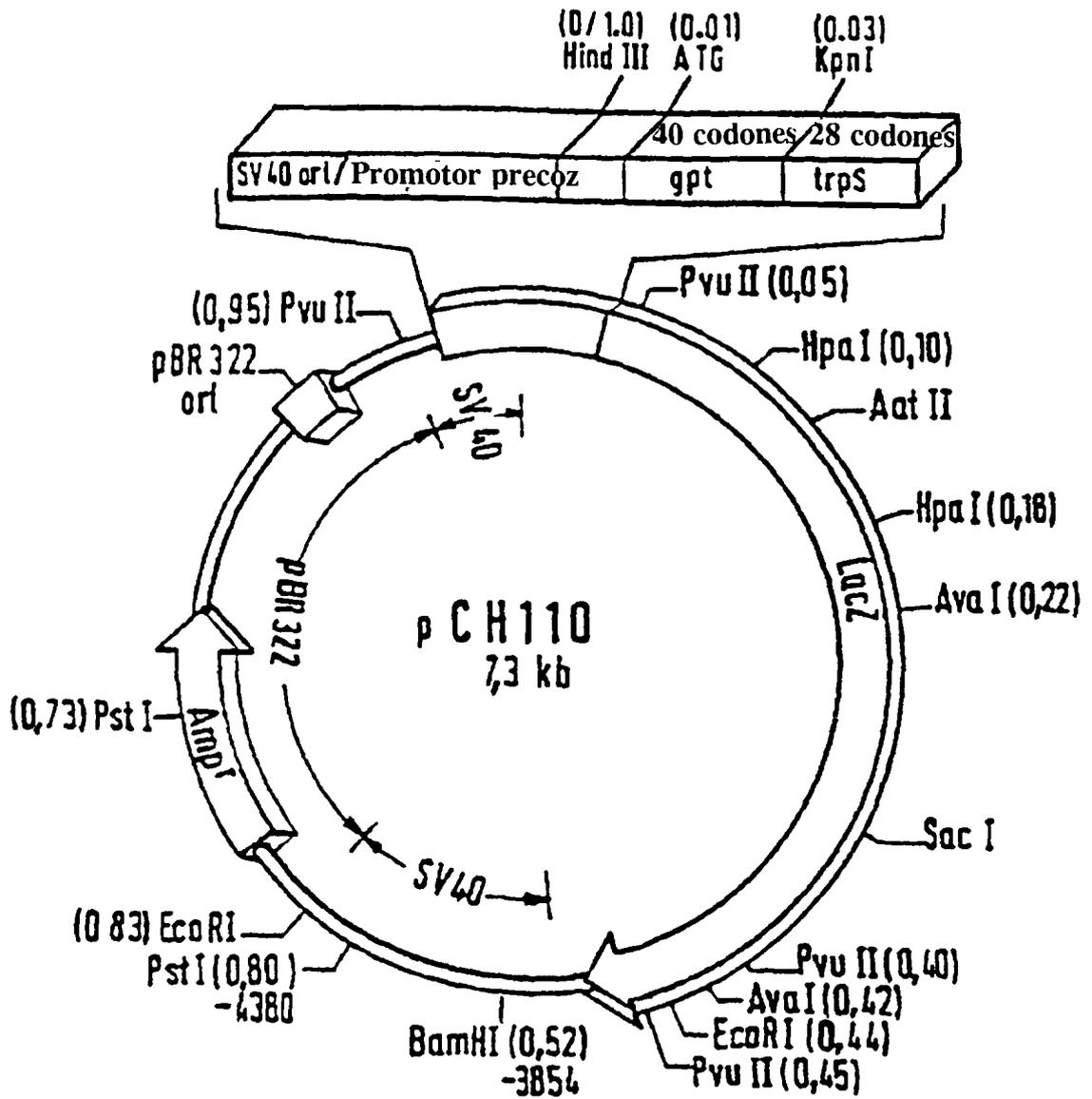


FIG. 5

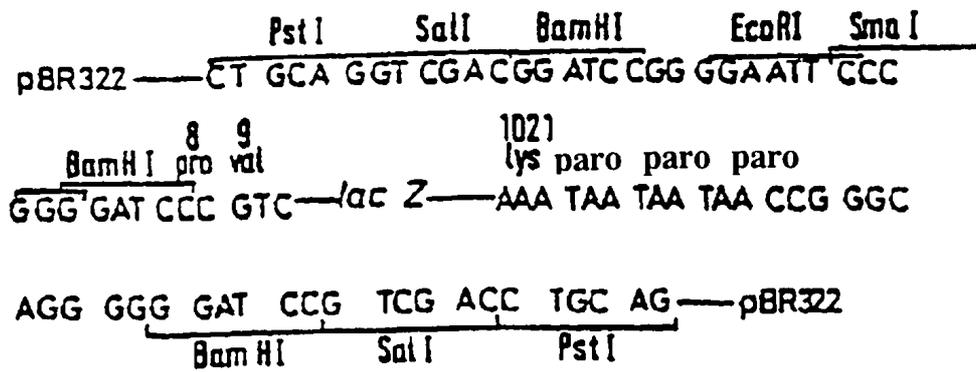
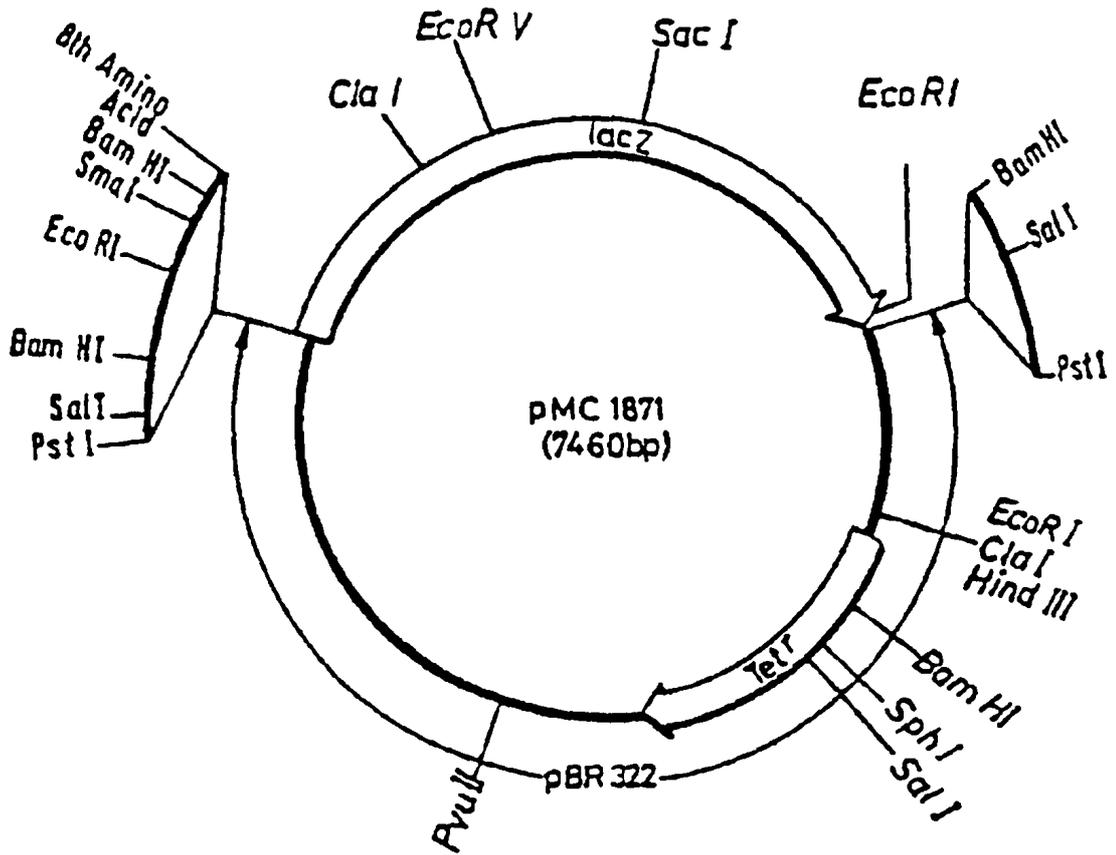


FIG. 6

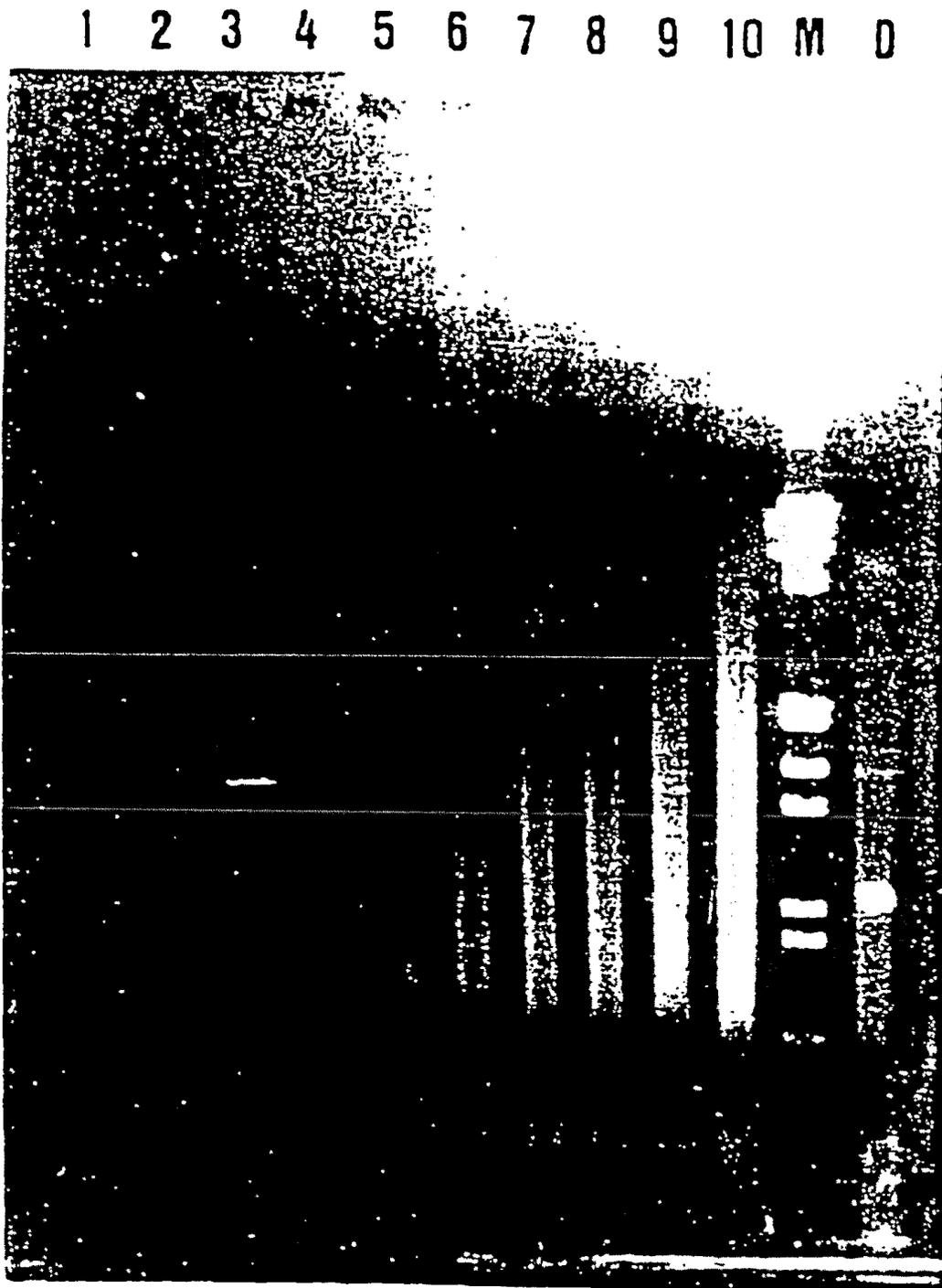


FIG. 7

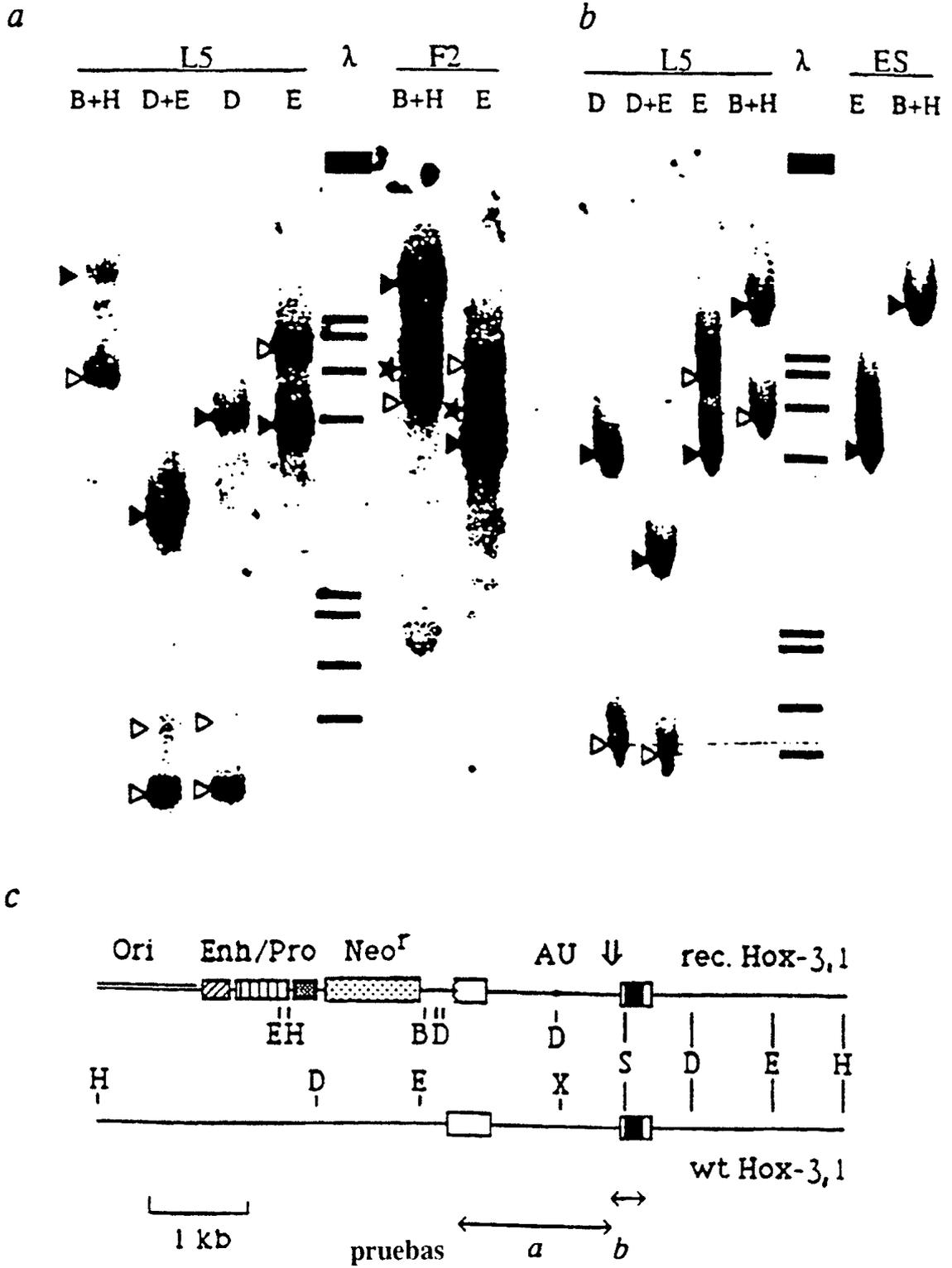


FIG. 8

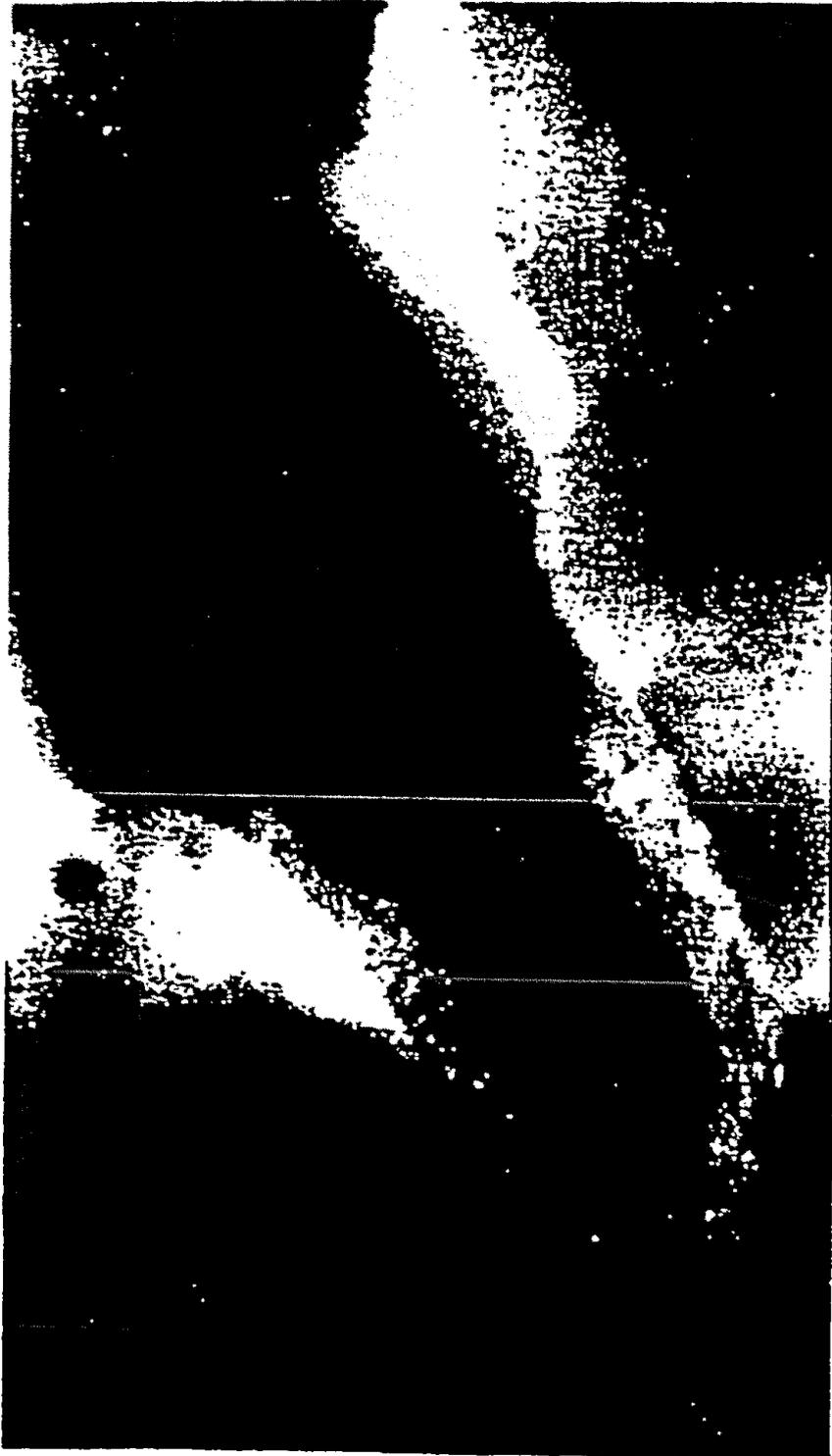


Fig. 9A



Fig. 9B



Fig. 9C