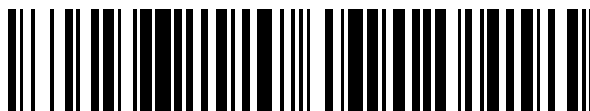


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 641**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2004** **E 04819142 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014** **EP 1689784**

54 Título: **Ribozimas autoescindibles y usos de las mismas**

30 Prioridad:

14.11.2003 US 519941 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.08.2014

73 Titular/es:

**CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION
(100.0%)
55 SHATTUCK STREET
BOSTON, MASSACHUSETTS 02115, US**

72 Inventor/es:

**MULLIGAN, RICHARD y
YEN, LAISING**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 488 641 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

Ribozimas autoescindibles y usos de las mismas

Antecedentes de la invención

- 5 Se están desarrollando enzimas de ARN (ribozimas) para el tratamiento de una serie de enfermedades que van desde los trastornos metabólicos congénitos a las infecciones víricas y las enfermedades adquiridas, tales como el cáncer. Las ribozimas se pueden utilizar tanto para reprimir como para reparar los genes patógenos. En algunos casos es deseable la administración exógena a corto plazo de ARN estabilizado, pero muchos tratamientos requerirán la introducción mediante virus para proporcionar la expresión del catalizador terapéutico a largo plazo.
- 10 Aunque están disponibles algunas variaciones de las ribozimas que se producen en la naturaleza, no han sido muy eficaces en las células de mamíferos. Existe la necesidad de desarrollar ribozimas modificadas que muestren una mejoría de la actividad y que funcionen en las células de mamíferos con una gran eficacia. Estas ribozimas son útiles para desarrollar sistemas de expresión génica regulada y que tengan un gran valor terapéutico.

Compendio de la invención

- 15 La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para nuevos sistemas de regulación génica basados en ribozimas que funcionan en las células de mamíferos. En algunos aspectos, la presente invención da a conocer una ribozima autoescindible, que escinde con eficacia una molécula de ARN que comprende la ribozima autoescindible. La terminología «ribozima», tal y como se utiliza en la presente memoria, incluye las ribozimas que se producen en la naturaleza (de tipo silvestre) y las ribozimas modificadas (denominadas mutantes o variantes). Una ribozima de ejemplo de la invención es una ribozima de esquistosoma y los mutantes de la misma.
- 20 De acuerdo con la presente invención, se da a conocer una ribozima autoescindible que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- cugagaugcagguacauccagcugacgagucccaaaauaggacgaaacgccuucggguguccuggaauccacug
cuauccac (SEQ ID NO: 3);
- cugagaugcagguacauccagcugaugagucccaaaauaggacgaaacgccuucggguguccuggaauccacu
gcuauccac (SEQ ID NO: 4);
- cugagaugcagguacauccagcugaugagucccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggauucca
cugcuauccac (SEQ ID NO: 5);
- 25 cugagaugcagguacauccacugaugagucccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggauucca
cugcuauccac (SEQ ID NO: 7);
- cugagaugcagguacauccacugaugagucccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggauucca
cugcuauccac (SEQ ID NO: 8);
- agguacauccagcugaugagucccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucuggaauccacu (SEQ ID n.º: 10);
- ccagcugaugagucccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugg (SEQ ID n.º: 11);
- cugaggugcagguacauccagcugacgagucccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggauucca
cugcuauccac (SEQ ID NO: 12);
- 30 cugagaugcagguacauccagcugacgagucccaaaauaggacgaaacgccuucggguguccuggaauccacug
cuauccac (SEQ ID NO: 14);
- cugagaugcagguacauccagcugaugagucccaaaauaggacgaaacgccuucggguguccuggaauccacu
gcuauccac (SEQ ID NO: 15);
- cugagaugcagguacauccacugaugagucccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggauucca
cugcuauccac (SEQ ID NO: 18);
- cugagaugcagguacauccacugaugagucccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggauucca
cugcuauccac (SEQ ID NO: 19);

cugagaugcagguacauccagcugaugagucccaaaauaggacgaaacgccuucgggcguccuggaauccacu
gcuauccac (SEQ ID NO: 20);

cugagaugcagguacauccagcugaugagucccaaaauaggacgaaacgccuucgggcgugcuggaauccacu
gcuauccac (SEQ ID NO: 21);

cugagaugcagguacauccagcugaugagucccaaaauaggacgaaacgccuucgggcguccuggaauccacu
gcuauccac (SEQ ID NO: 22);

cugagaugcagguacauccagcugaugagucccaaaauaggacgaaacgccuucgggcguaucuggaauccacu
gcuauccac (SEQ ID NO: 23);

5 cugagaugcagguacauccagcugaugagucccaaaauaggacgaaacgccuucgggcccuccuggaauccacugc
uauccac (SEQ ID NO: 24);

cugagaugcagguacauccagcugaugagucccaaaauaggacgaaacgccuucgggcccugcuggaauccacu
gcuauccac (SEQ ID NO: 25);

cugagaugcagguacauccagcugaugagucccaaaauaggacgaaacgccuucgggcccuccuggaauccacu
gcuauccac (SEQ ID NO: 26);

cugagaugcagguacauccagcugaugagucccaaaauaggacgaaacgccuucgggcccuaucuggaauccacug
cuauccac (SEQ ID NO: 27);

cugagaugcagguacauccagcugaugaguccuucgggacgaaacgccuucgggcguccuggaauccacugc
uauccac (SEQ ID NO: 28);

cugagaugcagguacauccagcugaugaguccuaaaacauaccagauuucgaucuggagaggugaagaauuc
10 gaccaccuaggacgaaacgcgcucggugcguccuggaauccacugcuauccac (SEQ ID NO: 30);

cugagaugcagguacauccagcugaugagucccaaaauaggacgaaacgcccuccgggcguccuggaauccacu
gcuauccac (SEQ ID NO: 31);

cugagaugcagguacauccagcugaugagucccaaaauaggacgaaacgccuucgggcguccuggaauccac
ugcuauccac (SEQ ID NO: 32);

cugagaugcagguacauccagcugaugagucccaaaauaggacgaaacgccauucgggcguccuggaauccacu
gcuauccac (SEQ ID NO: 33);

cugagaugcagguacauccagcugaugagucccaaaauaggacgaaacgccuucgggcguccuggaauccac
ugcuauccac (SEQ ID NO: 34);

cugaggugcagguacauccacugacgagucccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggaaucca
15 cugcuauccac (SEQ ID NO: 35);

cugaggugcagguacauccacugacgagucccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggaauccac
ugcuauccac (SEQ ID NO: 36);

cugaggugcagguacauccacugacgagucccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggaauccac
ugcuauccac (SEQ ID NO: 37);

cugaggugcagguacauccacugacgagucccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggaugcca
cugcuauccac (SEQ ID NO: 38);

cugaggugcagguacauccacugacgagucccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggaauaca
cugcuauccac (SEQ ID NO: 39);

cugaggugcagguacaucccacugacgaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucugggauugca
cugcuauccac (SEQ ID NO: 40);

cugaggugcagguacaucccacugacgaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucugggauuuca
cugcuauccac (SEQ ID NO: 41);

cugaggugcagguacaucccacugacgaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucugggauucaa
cugcuauccac (SEQ ID NO: 42);

cugaggugcagguacaucccacugacgaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucugggauucga
cugcuauccac (SEQ ID NO: 43);

cugaggugcagguacaucccacugacgaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucugggauucua
5 cugcuauccac (SEQ ID NO: 44);

cugaccagaugguacaucccagcugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcguccuggauuccac
aucuggcac (SEQ ID NO: 45);

cugaccagaugguacaucccagcugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcguccuggauacuac
aucuggcac (SEQ ID NO: 46);

cugagaugcagguacauccaucugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucauggauucca
cugcuauccac (SEQ ID NO: 50);

cugagaugcagguacaucccucugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucagggauucca
cugcuauccac (SEQ ID NO: 51);

cugagaugcagguacauccuacugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucuaggauucca
10 cugcuauccac (SEQ ID NO: 52);

cugagaugcagguacaucccacugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucugggauucca
cugcuauccac (SEQ ID NO: 53);

cugagaugcagguacauccgucugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucacggauucca
cugcuauccac (SEQ ID NO: 54);

cugaccagaugguacaucccagcugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcguccuggauuccac
aucuggcac (SEQ ID NO: 55);

cugaccaggugguacaucccagcugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcguccuggauucca
caucuggcac (SEQ ID NO: 56);

cugaccaggugguacaucccucugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucagggauucca
15 caucuggcac (SEQ ID NO: 57);

cugaccaggugguacaucccacugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucugggauucca
caucuggcac (SEQ ID NO: 58);

cugaggugcagguacaucccagcugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcguccuggauucca
cugcuauccac (SEQ ID NO: 59);

cugaggugcagguacaucccacugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucugggauucca
cugcuauccac (SEQ ID NO: 60);

cugaggugcagguacaucccagcuggaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcguccuggauucca
cugcuauccac (SEQ ID NO: 61);

cugaggugcagguacauccagcuggugagucccaauaggacgaaacgcgcucggugcguccuggauucca

cugcuauccac (SEQ ID NO: 62); and

cugagaugcuuuacgcgucugaugagucccaauaggacgaaacgcgcucggugcgucacgcguuguugcu

auccac (SEQ ID NO: 63).

En otro aspecto, se da a conocer una ribozima autoescindible que comprende la secuencia nucleotídica de:

cugagaugcagguacauccagcugaNgagucccaauaggacgaaacgcngggucgugauuccacugcaucca c (SEQ ID n.º: 64),

- 5 en donde cada N es independientemente cualquier nucleótido; cada A, U, G y C es adenosina, uridina, guanosina y citidina, respectivamente; y n es de 3 a 40 nucleótidos; y, de manera optativa, en donde la ribozima autoescindible comprende además otros nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia nucleotídica de la SEQ ID n.º 64.

Preferiblemente, el motivo de ARN de la ribozima autoescindible tiene una secuencia nucleotídica de:

cugagaugcagguacauccagcugaNgagucccaauaggacgaaacgcucggggucgugauuccacugcau

ccac (SEQ ID NO: 65),

- 10 en donde N es cualquier nucleótido; cada A, U, G y C es adenosina, uridina, guanosina y citidina, respectivamente; y, de manera optativa, en donde la ribozima autoescindible comprende además otros nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia nucleotídica de la SEQ ID n.º 65; y además, de manera optativa, en donde N es el nucleótido U.

- 15 En otro aspecto se da a conocer un ácido nucleico que codifica una ribozima autoescindible según está descrito más arriba.

En otro aspecto se da a conocer un ácido nucleico que codifica (i) una ribozima autoescindible tal y como se describe más arriba y (ii) un aptámero en una posición de tal forma que la actividad escisora de dicha ribozima autoescindible se pueda modular mediante la fijación de un efector al aptámero.

- 20 Aún otro aspecto más da a conocer una molécula polinucleotídica recombinante que comprende: (a) un promotor; (b) un ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico; y (c) un ácido nucleico que codifica una ribozima autoescindible tal y como se describe más arriba, en donde el ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) están operativamente unidos al promotor y la transcripción del ácido nucleico de (b) y del ácido nucleico de (c) produce una molécula de ARN que comprende dicha ribozima autoescindible y un ARNm que codifica dicho producto de ácido nucleico, en donde dicha ribozima autoescindible es capaz de escindir dicha molécula de ARN de forma intramolecular.

- 25 Preferiblemente, la molécula polinucleotídica recombinante descrita más arriba comprende un ácido nucleico que codifica un aptámero que está en una posición de tal forma que la actividad de escisión de la ribozima autoescindible se puede regular por la fijación de un efector al aptámero; y en cuyo caso, de manera optativa, o bien: (a) en donde el ácido nucleico de (c) codifica al menos dos de las ribozimas autoescindibles; o bien (b) en donde la ribozima fosforotioato de ARN 2'-O-metoxietilado: (i) en donde la molécula polinucleotídica recombinante está presente en el genoma de una célula; o (ii) en donde la molécula polinucleotídica recombinante está presente en un vector.

- 30 Otro aspecto de la presente invención da a conocer una célula hospedadora aislada: (a) transformada con el ácido nucleico tal y como se describe más arriba; (b) que comprende la molécula polinucleotídica recombinante tal y como se describe más arriba; y en cuyo caso, de manera optativa: (i) en donde la célula es una célula de mamífero; o (ii) en donde la célula comprende además un agente que inhibe la escisión de la ribozima autoescindible, en donde el agente se selecciona del grupo que consiste en inhibidores aminoglucósidos, toyocamicina, 8-azaadenosina, sangivamicina, tubercidina, monofosfato cíclico de tubercidina, monofosfato de tubercidina, trifosfato de tubercidina, nebularina, nucleósido tricíclico, 5-fluorouridina, 5-bromouridina, 5-fluorouracilo, Syto-83, bromuro de etidio, naranja de acridina y un oligonucleótido antisentido de dicha ribozima autoescindible; o (c) que comprende el ácido nucleico descrito más arriba.

- 35 Un aspecto más da a conocer un vector vírico o un virus, que comprende: (a) un promotor; (b) un ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico; (c) un ácido nucleico que codifica una ribozima autoescindible tal y como se describe más arriba, y en donde el ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) están operativamente unidos al promotor y la transcripción del ácido nucleico de (b) y del ácido nucleico de (c) produce una molécula de ARN que comprende dicha ribozima autoescindible y un ARNm que codifica dicho producto de ácido nucleico, en donde dicha ribozima autoescindible es capaz de escindir dicha molécula de ARN de forma intramolecular.

45 Preferiblemente, el ácido nucleico de (c) comprende además un ácido nucleico que codifica un aptámero que está en una posición de tal forma que la actividad de escisión de dicha ribozima autoescindible se puede regular por la fijación de un efector a dicho aptámero.

Otro aspecto da a conocer un oligonucleótido antisentido modificado a partir de una ribozima autoescindible tal y como se describe más arriba.

Preferiblemente, el oligonucleótido antisentido modificado: (a) se selecciona del grupo que consiste en: morfolino, fosforotioato de ARN, ARN 2'-O-metilado, y fosforotioato de ARN 2'-O-metoxietilado; o (b) dicho oligonucleótido antisentido modificado aparea sus bases con una región de la ribozima autoescindible tal y como se presenta en gugcguccuggauuccacugcaucc (SEQ ID n.º 67).

En un aspecto final de la presente invención se da a conocer un kit para regular la expresión génica, que comprende un ácido nucleico que comprende: (a) una secuencia que codifica una ribozima autoescindible tal y como se describe más arriba, y (b) un sitio de clonación para introducir una secuencia nucleotídica que se desea transcribir operativamente unida a la secuencia que codifica dicha ribozima autoescindible.

Preferiblemente, el (a) comprende un agente que inhibe la escisión de la ribozima autoescindible, en donde el agente se selecciona del grupo que consiste en inhibidores de aminoglucósidos, toyocamicina, 8-azaadenosina, sangivamicina, tubercidina, monofosfato cíclico de tubercidina, monofosfato de tubercidina, trifosfato de tubercidina, nebularina, nucleósido tricíclico, 5-fluorouridina, 5-bromouridina, 5-fluorouracilo, Syto-83, bromuro de etidio, naranja de acridina y un oligonucleótido antisentido de dicha ribozima autoescindible, en donde la transcripción de dicha secuencia nucleotídica deseada está inhibida en ausencia del inhibidor; o (b) en donde el ácido nucleico comprende al menos dos de dichas ribozimas autoescindibles.

Los motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma, también denominados motivos mutantes de ARN de esquistosoma, son mutantes de la ribozima de esquistosoma y ribozimas de esquistosoma modificadas. Esta terminología se utiliza indistintamente en la presente memoria. Los motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma que se describen incluyen una modificación en una posición de un motivo de ARN autoescindible de esquistosoma que da lugar a la modulación o la alteración de la actividad escisora del motivo de ARN autoescindible de esquistosoma. Los motivos de ARN autoescindibles de esquistosoma o las ribozimas de esquistosoma son miembros de la familia de ribozimas en cabeza de martillo y se caracterizan por su estructura secundaria. Las ribozimas en cabeza de martillo se componen de elementos estructurales que incluyen tres hélices, denominadas tallo I, tallo II y tallo III, y articuladas en un núcleo central de 11-12 nucleótidos monocatenarios. Las ribozimas en cabeza de martillo pueden también contener estructuras en lazo que se extienden desde algunas o todas las hélices. Estos lazos se numeran de acuerdo a el tallo desde el cual se extienden (p. ej., lazo I, lazo II y lazo III). Los mutantes de ARN de esquistosoma de la presente invención se diferencian en una o más modificaciones de un ARN autoescindible de esquistosoma que se produce en la naturaleza, modificaciones que pueden ser adición, delección, sustitución y/o alteración de al menos un (uno o más) nucleótido. Tales modificaciones pueden dar lugar a la adición de elementos estructurales, tales como la adición de un lazo o un tallo; alargamiento o acortamiento de un lazo o tallo existente; cambio de la composición o de la estructura de uno o varios lazos o uno o varios tallos; o cualquier combinación de éstos.

También describimos un motivo de ARN autoescindible de esquistosoma que está modificado para incluir un lazo en el tallo III. Un lazo en el tallo III también se denomina en la presente memoria un lazo III. Un motivo de ARN autoescindible de esquistosoma que incluye un lazo en el tallo III también se denomina en la presente memoria un motivo de ARN autoescindible de esquistosoma que incluye un lazo III. Un motivo de ARN autoescindible de esquistosoma que incluye un lazo III es un ejemplo de un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma.

El motivo de ARN autoescindible de esquistosoma que se produce en la naturaleza no contiene un lazo en el tallo III. Tal y como se describe en la presente memoria, la adición de un lazo III incrementa la actividad de escisión del motivo de ARN autoescindible de esquistosoma. El lazo del tallo III (lazo III) puede comprender al menos tres nucleótidos, p. ej., el lazo III comprende 5'-UUCG-3', el lazo III comprende 5'-CUUCGG-3', el lazo III comprende 5'-GCWCGGU-3'. Los lazos pueden comprender nucleótidos que se pueden aparear con otras bases y dar lugar a estructuras que no son un lazo. Los motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma se ilustran en los ejemplos de trabajo.

También describimos motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma que incluyen otros elementos estructurales o secuencias nucleotídicas que modulan la actividad de escisión de los motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma descritos en la presente memoria, tales como restos de aptámero. Los motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma pueden comprender uno o más de estos otros elementos estructurales y secuencias nucleotídicas.

Se describe el uso de secuencias de aptámero para controlar la actividad de escisión de los motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma.

Un aptámero es una secuencia nucleotídica a la que se puede fijar una molécula efectora; una molécula efectora es un ligando que se fija al aptámero. Las secuencias de aptámero se pueden insertar en una posición de un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma de tal forma que la actividad de escisión del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma se puede controlar mediante la fijación de un efector a la secuencia del aptámero. La actividad de escisión del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma se puede modular

mediante la fijación de un efector a una secuencia de aptámero que está insertada en una posición del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma de tal forma que la actividad de escisión está controlada por la fijación del efector a la secuencia de aptámero. Estar insertado, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la incorporación o a la adición de la secuencia del aptámero en el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma. El inserto puede colocarse dentro de la secuencia mutante de ARN autoescindible de esquistosoma, tal como, por ejemplo, una inserción dentro de la secuencia del tallo I. Otra alternativa es que el inserto puede estar fuera de la estructura secundaria normal del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma de una manera similar a las modificaciones del lazo III. Adicionalmente, se puede insertar un aptámero en tallo II, tallo III, lazo I, lazo II, lazo III, el núcleo nucleotídico o una combinación de dos o más de los elementos estructurales antes mencionados del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma. También se describen ácidos nucleicos, construcciones (ADN o ARN) que codifican los motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma y el ARN de esquistosoma, descritos e ilustrados en la presente memoria. Las construcciones, tales como construcciones de ADN, se pueden utilizar solas o en un vector, tal como un plásmido o un vector vírico.

También se describen construcciones de ADN que comprenden: (a) un promotor; (b) ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico y operativamente unido al promotor; y (c) ácido nucleico que codifica un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma tal y como se describe en la presente memoria. El ácido nucleico que codifica el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma puede estar en 5' del ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico o en 3' del ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico, y está operativamente unido al promotor. La terminología «promotor» se refiere a un ácido nucleico que, cuando está operativamente unido al ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico, es suficiente para que se inicie la transcripción del ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico que hay que expresar. La transcripción del ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico y el ácido nucleico que codifica el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma produce un ARNm que comprende el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma y un ARNm que codifica el producto de ácido nucleico. La actividad de escisión del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma controla la escisión del ARNm y, como resultado, la expresión del producto de ácido nucleico; el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma está localizado en el ARNm en una posición tal que el producto de ácido nucleico no se expresa cuando el ARNm está escindido. Tal y como se utiliza en la presente memoria, un «producto de ácido nucleico» es una proteína o polipéptido, ADN o ARN diferente al motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma. En una realización concreta, el producto de ácido nucleico es una proteína terapéutica.

En las condiciones adecuadas para la transcripción del ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico y el ácido nucleico que codifica el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma, se producen un ARNm del producto de ácido nucleico y el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma. La autoescisión del ARNm mediante el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma impide la expresión del producto del ácido nucleico. El tratamiento de una célula o de un individuo, en el cual están presentes construcciones de ADN de la invención, con un agente tal como un fármaco (p. ej., un antibiótico) u otra molécula o composición, que inhibe (total o parcialmente) la actividad de escisión del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma, da lugar a la expresión del producto de ácido nucleico codificado por el ARNm.

También se describen construcciones de ADN que comprenden: (a) un promotor; (b) ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico operativamente unido al promotor; y (c) ácido nucleico que codifica un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma que incluye un aptámero insertado en una posición del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma de tal forma que la actividad de escisión del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma se puede controlar (es regulable) por la fijación de un efector al aptámero. La fijación de un efector al aptámero da lugar a la modulación (inducción, refuerzo, reducción, inhibición (total o parcial) o regulación) de la actividad de escisión del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma. Si la fijación del efector al aptámero reduce o inhibe la actividad de escisión del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma, no se produce, o se reduce, la escisión del ARNm, y se expresa el producto de ácido nucleico. Si la fijación del efector al aptámero no inhibe la actividad de escisión del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma, se escinde el ARNm y, como resultado, el producto de ácido nucleico no se expresa (no se produce).

Las construcciones de ADN pueden comprender el ácido nucleico que codifica dos o más (varios) motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma de la invención. Muchos motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma pueden comprender los mismos o diferentes motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma. Muchos motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma codificados por un ácido nucleico se añaden de 5' a 3'. Por ejemplo, el extremo 3' del ácido nucleico que codifica el primer motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma se une al extremo 5' del ácido nucleico que codifica el siguiente motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma. Opcionalmente, los dos motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma pueden estar separados por un conector de ácido nucleico. Por lo general, el ácido nucleico que codifica el motivo mutante del (uno o varios) ARN autoescindible de esquistosoma está cadena arriba del ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico. Así pues, el orden de los componentes (de 5' a 3') puede ser promotor - ácido nucleico que codifica un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma - ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico.

Además del ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico a expresar, los vectores pueden comprender otros componentes más tales como un potenciador, secuencias de tránsito, sitios de fijación transcripcional y ácidos nucleicos de esqueleto.

También se describen células hospedadoras que comprenden una construcción de ADN de la presente invención. La construcción comprende: (a) un promotor; (b) ácido nucleico que codifica un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma de la invención; y (c) un ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico operativamente unido al promotor. El ácido nucleico que codifica el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma y el ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico están después del promotor. La transcripción del ácido nucleico de (b) y del ácido nucleico de (c) produce un ARNm que comprende el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma y un ARNm que codifica el producto de ácido nucleico. La actividad de escisión del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma controla la escisión del ARNm y, como resultado, la expresión del producto de ácido nucleico.

Las células hospedadoras pueden comprender un ácido nucleico que codifica un aptámero que está insertado en un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma, tal y como se describe más arriba. Opcionalmente, las células hospedadoras también pueden comprender un ácido nucleico que codifica dos o más (p. ej., varios) motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma del esquistosoma de la invención.

También se describen líneas celulares de empaquetamiento útiles para generar vectores víricos y virus recombinantes, así como la construcción de tales líneas celulares y los procedimientos para utilizar los vectores víricos y los virus recombinantes para modular la producción de un producto de ácido nucleico *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. Las líneas celulares útiles para generar vectores víricos y virus recombinantes de la invención se producen mediante la transfección de células hospedadoras, tales como células hospedadoras de mamífero, con un vector vírico o virus.

También se describe el uso de los motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma descritos en la presente memoria en los procedimientos para modular la expresión de un producto de ácido nucleico en una célula hospedadora o en un individuo. La expresión del producto de ácido nucleico se modula a través del control de la escisión *in cis* de un ARNm que codifica el producto de ácido nucleico. Mediante modulación se hace referencia a la inducción, mejora (incremento), reducción, inhibición (total o parcial) o regulación de un proceso. En una realización concreta, la modulación de la expresión se refiere a la capacidad para incrementar (mejorar) la expresión del producto de ácido nucleico. En otra realización concreta, la modulación de la expresión se refiere a la reducción de la expresión del producto de ácido nucleico. Así pues, la modulación puede ser positiva (incremento) o negativa (disminución). Por regular se entiende la capacidad para controlar la velocidad y/o la magnitud a la cual se produce un proceso. Por ejemplo, la regulación de la actividad de un motivo de ARN autoescindible se refiere al control de la velocidad y la magnitud a la cual se produce la actividad del motivo de ARN autoescindible. La regulación de la expresión de un ácido nucleico se refiere al control de la velocidad y la magnitud a la cual se produce la expresión del producto de ácido nucleico.

También se describe un procedimiento de modulación de la expresión de un producto de ácido nucleico en una célula hospedadora que comprende la introducción, en la célula hospedadora, de una construcción de ADN que comprende: (a) un promotor; (b) un ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico operativamente unido al promotor; y (c) un ácido nucleico que codifica un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma, de tal manera que la transcripción de los ácidos nucleicos produce una molécula de ARN que comprende el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma y un ARNm que codifica el producto de ácido nucleico, en donde el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma es capaz de escindir intramolecularmente sus propio ARN. La expresión en las células se modula a través del control de la escisión de un ARNm que codifica el producto de ácido nucleico. La escisión del ARNm se controla a través de la actividad de un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma, que está colocado en el ARNm en una posición de tal manera que el producto de ácido nucleico no se expresa cuando se expresa el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma. En las condiciones que permiten la expresión del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma, se escinde el ARNm y, como resultado, no se produce el producto de ácido nucleico codificado. En este procedimiento, la célula hospedadora que comprende la construcción de ADN se cultiva en presencia de un agente, tal como un fármaco (p. ej., antibiótico) u otra molécula o composición, que inhibe o reduce la actividad de escisión del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma de tal manera que se expresa el producto de ácido nucleico codificado por el ARNm. Las construcciones de ADN utilizadas en este procedimiento pueden comprender además el ácido nucleico que codifica un aptámero que se encuentra en una posición de tal manera que la actividad de escisión del motivo de ARN autoescindible de esquistosoma se puede regular por la fijación de un efector al aptámero y/o ácido nucleico que codifica varios motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma según se describe en la presente memoria.

También se describe un procedimiento para expresar o modular la expresión de un producto de ácido nucleico en un individuo (p. ej., un humano u otro mamífero o vertebrado). El procedimiento comprende la modulación de la expresión de un producto de ácido nucleico a partir de una construcción de ADN de la invención que está presente en (contenida en) las células del individuo. La construcción de ADN comprende el ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico y el ácido nucleico que codifica un motivo mutante de ARN autoescindible de

esquistosoma de la invención cuya actividad puede, a su vez, estar modulada por un agente cuando se tiene que expresar el producto de ácido nucleico. La transcripción del ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico y el ácido nucleico que codifica el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma produce un ARNm que comprende el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma y un ARNm que codifica el producto de ácido nucleico.

La expresión del producto de ácido nucleico puede efectuarse mediante la administración de un antibiótico a un individuo, en el que algunas células contienen una construcción de ADN. La construcción de ADN comprende: (a) un promotor; (b) ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico operativamente unido al promotor; y (c) ácido nucleico que codifica un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma de la invención. La transcripción del ácido nucleico de (b) y del ácido nucleico de (c) produce un ARNm que comprende el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma y un ARNm que codifica el producto de ácido nucleico. Como resultado, se inhibe (parcial o totalmente) la actividad del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma codificado, con el resultado de que en el individuo se expresa el producto de ácido nucleico de interés. La construcción de ADN se puede introducir en las células del individuo *in vivo* (p. ej., al introducir la construcción de ADN en un tejido o líquido corporal del individuo) o *ex vivo* (p. ej., al introducir la construcción de ADN en las células obtenidas del individuo o de otro individuo o fuente (diferentes) y a continuación introducir las células resultantes en el individuo). En cualquier caso, la administración de un antibiótico da lugar a la inhibición de la actividad del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma y, como resultado, no se escinde el ARNm que codifica el producto de ácido nucleico de interés y se expresa el producto de ácido nucleico de interés.

El procedimiento se puede realizar mediante: (a) la obtención de células de un individuo y el mantenimiento las células en las condiciones adecuadas para el crecimiento celular y la división celular; (b) la introducción, en las células, de una construcción de ADN de la invención; (c) la devolución de las células producidas en la etapa (b) al individuo; y (d) la administración al individuo de un agente que inhibe la escisión del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma. La construcción de ADN puede comprender: (a) un promotor; (b) ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico que hay que expresar operativamente unido al promotor; y (c) ácido nucleico que codifica un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma. El ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico que hay que expresar y el ácido nucleico que codifica el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma están después del promotor. La transcripción del ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico y el ácido nucleico que codifica el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma produce un ARNm que comprende el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma y un ARNm que codifica el producto de ácido nucleico.

El agente puede ser, por ejemplo, un antibiótico.

También se describe un procedimiento para regular la expresión de un gen endógeno (un gen residente en una célula cuando se obtuvo la célula) para producir un producto de ácido nucleico y las composiciones útiles en el procedimiento. El gen endógeno puede ser uno que se expresa (está «encendido») en la célula o uno que normalmente no se expresa (está «apagado») en la célula, pero cuya expresión está o ha sido encendida o activada. Una construcción de ADN que codifica un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma se introduce en un ADN genómico de células en tal posición que, en el ARNm producido por las células, el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma se encuentra en una localización que da lugar al control de la expresión del producto de ácido nucleico codificado. En ausencia de un agente que inhibe la expresión del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma, se produce la escisión y no se expresa el producto de ácido nucleico. En presencia de tal agente, se inhibe la actividad de escisión y se expresa el producto de ácido nucleico. En una realización, el ADN que codifica un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma de la invención se puede introducir sólo o en un vector, en un ADN genómico entre el promotor operativamente unido (que controla la expresión) del gen endógeno que codifica el producto de ácido nucleico, de tal manera que el gen endógeno permanece operativamente unido al promotor. Otra alternativa es que el ADN que codifica un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma se puede introducir, solo o en un vector, en el ADN genómico en 3' del gen endógeno que codifica el producto de ácido nucleico. El promotor que está operativamente unido al gen endógeno que hay que expresar puede ser el promotor que tiene el gen de forma natural (endógeno) o puede ser un promotor exógeno introducido en el ADN genómico. Las células resultantes se pueden utilizar, como se describe en la presente memoria, para modular la producción del producto de ácido nucleico en un individuo.

La expresión del producto de ácido nucleico se puede efectuar mediante la administración, a una célula o a un individuo, de un oligonucleótido antisentido de un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma. Algunas de estas células contienen una construcción de ADN, en donde la construcción de ADN comprende: (a) un promotor; (b) ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico operativamente unido al promotor; y (c) ácido nucleico que codifica un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma de la invención. La transcripción del ácido nucleico de (b) y del ácido nucleico de (c) produce un ARNm que comprende el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma y un ARNm que codifica el producto de ácido nucleico. Como resultado, la actividad del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma codificado está inhibida (parcial o totalmente) por el oligonucleótido antisentido, con el resultado de que el producto de ácido nucleico de interés se expresa en la célula o individuo. Preferiblemente, el oligonucleótido antisentido aparea sus bases con una región del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma según se describe en la SEQ ID n.º 67. Por ejemplo, el oligonucleótido

antisentido es un oligonucleótido modificado que se selecciona del grupo que consiste en: morfolino, fosforotioato de ARN, ARN 2'-O-metilado, y fosforotioato de ARN 2'-O-metoxietilado.

También se describe un procedimiento para inducir específicamente la expresión de un gen deseado en una célula, que comprende poner en contacto la célula con un oligonucleótido antisentido que inhibe específicamente un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma, en donde el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma está presente en una molécula de ARN que codifica el producto génico deseado. La célula que comprende la molécula de ARN se cultiva en las condiciones adecuadas para que el oligonucleótido antisentido inhiba la escisión de la molécula de ARN mediante el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma. El procedimiento se basa en parte en la capacidad de los oligonucleótidos específicos para discriminar diferentes motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma. Opcionalmente, el procedimiento se puede utilizar para generar muchos sistemas independientes para la regulación génica.

De igual forma, se describe un procedimiento para la modulación (inducción o inhibición) específica de la expresión de un gen deseado en una célula, que comprende poner en contacto la célula con un efector que se fija específicamente a un aptámero, en donde el aptámero está manipulado genéticamente para que esté presente en una molécula de ARN que codifica el producto del gen deseado y un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma. La célula que comprende la molécula de ARN se cultiva en las condiciones adecuadas para la interacción entre el efector y el aptámero de tal manera que la interacción modula la escisión de la molécula de ARN mediante el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma según se describe más arriba. Este procedimiento se basa en parte en la capacidad que tienen los efectores específicos para discriminar entre diferentes aptámeros. Opcionalmente, el procedimiento se puede utilizar para generar muchos sistemas independientes para la regulación génica.

También se describen oligonucleótidos antisentido modificados de un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma. Preferiblemente, los oligonucleótidos antisentido aparean sus bases con una región diana del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma según se describe en la SEQ ID n.º 67. Los ejemplos de oligonucleótidos antisentido modificados incluyen, pero sin limitarse a ellos, morfolino, fosforotioato de ARN, ARN 2'-O-metilado y fosforotioato de ARN 2'-O-metoxietilado.

También se describe un procedimiento para el escrutinio en busca de un agente que inhiba la actividad catalítica de un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma que comprende: (a) introducir en las células hospedadoras una construcción de ADN que comprende: (1) un promotor, (2) ácido nucleico que codifica un indicador que está operativamente unido al promotor y (3) ácido nucleico que codifica un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma, en donde el ácido nucleico de (2) y el ácido nucleico de (3) están después del promotor, en donde la construcción de ADN se introduce en las células hospedadoras en las condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico que codifica el indicador y el ácido nucleico que codifica el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma; (b) poner en contacto las células hospedadoras con un agente para valorar su capacidad para inhibir la actividad catalítica del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma en las condiciones que dan lugar a la introducción del agente en las células; y (c) ensayar la actividad del indicador en las células hospedadoras. Si la actividad detectada del indicador en presencia del agente es mayor que la actividad detectada del indicador en ausencia del agente, se identifica el agente como uno que inhibe la actividad catalítica de un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma.

También se describe un procedimiento para el escrutinio en busca de un efector que se fije a un aptámero (o a una secuencia de ARN) y que inhiba la actividad catalítica de un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma. En este procedimiento, se introduce en las células hospedadoras una construcción de ADN que comprende: (1) un promotor, (2) ácido nucleico que codifica un indicador operativamente unido al promotor y (3) ácido nucleico que codifica un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma que incluye un aptámero localizado en una posición de tal manera que la actividad de escisión que tiene el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma se puede regular por la fijación de un efector al aptámero, en donde el ácido nucleico de (2) y el ácido nucleico de (3) están después del promotor, y la transcripción del ácido nucleico de (2) y del ácido nucleico de (3) produce un ARNm que comprende el aptámero-motivo de ARN autoescindible de esquistosoma (o secuencia de ARN-motivo de ARN autoescindible de esquistosoma) y el ARNm que codifica el indicador. Las células hospedadoras se ponen en contacto con un agente para valorarle su capacidad para fijarse al aptámero (o secuencia de ARN) en las condiciones adecuadas para la expresión del indicador y del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma, y la actividad del indicador se ensaya en las células hospedadoras. Si la actividad del indicador detectada en presencia del agente es mayor que la actividad del indicador detectada en ausencia del agente, el agente se dice que es un efector que puede fijarse al aptámero (o secuencia de ARN) y que inhibe la actividad catalítica de un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma.

También se describe un procedimiento para producir un animal no humano transgénico mediante la utilización del motivo de ARN autoescindible de esquistosoma. El animal transgénico se produce mediante la introducción de una construcción de ADN en una célula reproductora de un animal no humano o la célula reproductora de su ancestro, en donde la construcción de ADN comprende: (a) un promotor, (b) ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico operativamente unido al promotor y (c) ácido nucleico que codifica un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma. El ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) se encuentran después del

promotor, y la transcripción del ácido nucleico de (b) y del ácido nucleico de (c) produce un ARNm que comprende el motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma y el ARNm que codifica el producto de ácido nucleico.

También se describe un kit para regular la expresión génica. Por ejemplo, el kit comprende un ácido nucleico que comprende: (a) una secuencia mutante de la ribozima de esquistosoma; y (b) un sitio de clonación para introducir una secuencia nucleotídica deseada que hay que transcribir operativamente unida a la secuencia mutante de la ribozima de esquistosoma. Opcionalmente, el kit puede comprender además un inhibidor del mutante de la ribozima de esquistosoma. Por ejemplo, el mutante de la ribozima de esquistosoma comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de las SEQ ID n.º 1-63. El inhibidor del kit incluye, pero sin limitarse a ellos, toyocamicina, 8-azaadenosina, sangivamicina, tubercidina, monofosfato cíclico de tubercidina, monofosfato de tubercidina, trifosfato de tubercidina, nebularina, nucleósido tricíclico, 5-fluorouridina, 5-bromouridina, 5-fluorouracilo, Syto-83, bromuro de etidio y naranja de acridina.

También se describe un procedimiento para determinar la cantidad de un inhibidor de un mutante de la ribozima de esquistosoma que hay en una célula. En este procedimiento se introduce en una célula una construcción de ADN que comprende: (1) un promotor; (2) un ácido nucleico que codifica un indicador; y (3) un ácido nucleico que codifica un mutante de la ribozima de esquistosoma, en donde el ácido nucleico de (2) y el ácido nucleico de (3) están después del promotor y operativamente unidos a dicho promotor, en las condiciones que dan lugar a la inhibición del mutante de la ribozima y a la expresión del indicador. Se analiza la actividad del indicador, en donde se identifica la cantidad de dicho inhibidor que hay en la célula por comparación de la actividad del indicador con un control adecuado. Preferiblemente, el inhibidor es 5-fluorouracilo o 5-fluorouridina. En algunos casos, el indicador se selecciona de β -galactosidasa, β -glucoronidasa, β -glucosidasa, cloranfenicol acetil transferasa (CAT), proteína fluorescente verde y luciferasa. Opcionalmente, la célula es una célula cancerosa.

También se describe un procedimiento para determinar la cantidad de un inhibidor de un mutante de la ribozima de esquistosoma que hay en una muestra biológica. En este procedimiento se pone en contacto una célula con una muestra biológica, en donde la célula está genéticamente manipulada para que exprese una construcción de ADN que comprende: (1) un promotor; (2) un ácido nucleico que codifica un indicador; y (3) un ácido nucleico que codifica un mutante de la ribozima de esquistosoma, en donde el ácido nucleico de (2) y el ácido nucleico de (3) están después del promotor y operativamente unidos a dicho promotor, en las condiciones que dan lugar a la inhibición del mutante de la ribozima y a la expresión del indicador. Se analiza la actividad del indicador, en donde se identifica la cantidad de dicho inhibidor que hay en la muestra biológica al comparar la actividad del indicador con un control adecuado.

También se describe un procedimiento para inhibir la actividad de un ARN catalítico en una célula, que comprende poner en contacto una célula con un inhibidor de un mutante de la ribozima de esquistosoma. Preferiblemente, la célula se ha infectado o corre el riesgo de tener una infección con un virus o un microorganismo patógeno. Por ejemplo, el inhibidor se selecciona de toyocamicina, 8-azaadenosina, sangivamicina, tubercidina, monofosfato cíclico de tubercidina, monofosfato de tubercidina, trifosfato de tubercidina, nebularina, nucleósido tricíclico, 5-fluorouridina, 5-bromouridina, 5-fluorouracilo, Syto-83, bromuro de etidio y naranja de acridina. En algunos casos, el inhibidor es un oligonucleótido antisentido, que incluye un oligonucleótido antisentido modificado (p. ej., morfolino, fosforotioato de ARN, ARN 2'-O-metilado, o fosforotioato de ARN 2'-O-metoxietilado).

También se describe un procedimiento para inhibir la infección mediante un virus o un microorganismo patógeno en una célula, que comprende poner en contacto una célula con un inhibidor de un mutante de la ribozima de esquistosoma. La infección puede estar provocada por un virus (p. ej., un virus de inmunodeficiencia humana, un virus del herpes, un virus de la hepatitis o un virus del papiloma humano) o un microorganismo patógeno (p. ej., *Notophthalmus virdescens*, *Ambystoma talpoideum*, *Amphiuma tridactylum* y *Schistosoma mansoni*). La célula puede ser una célula de animal (p. ej., una célula de mamífero) o una célula vegetal (p. ej., tabaco).

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1a-1g muestran la estrategia para controlar la expresión génica mediante la modulación de la autoescisión del ARN y la optimización de la actividad de autoescisión de la ribozima de esquistosoma Sm1. (a) cuando una ribozima en cabeza de martillo que actúa en *cis* se inserta en el ARNm, la autoescisión conduce a la destrucción del ARNm y a que no se exprese el gen. Sin embargo, un mutante inactivo o la administración de inhibidores específicos de la ribozima conducen a la generación de los ARNm intactos y a que se exprese la proteína. (b) El vector pMD que expresa el gen indicador que se utilizó para el ensayo de transfección, y las posiciones en donde se colocó la ribozima. El sitio de la caperuza está al comienzo del ARNm; el sitio A delante del intrón; los sitios B, C y D en el intrón; el sitio E inmediatamente delante del inicio de traducción; los sitios F y G en la región en 3' que no se traduce. (c) a (g): optimización de la actividad de la Sm1 de esquistosoma (SEQ ID n.º 1-12). (c) y (d), ribozima insertada en la posición A del vector pMD; (e) a (g) en la posición E del vector. Los mutantes inactivos correspondientes contenían una sustitución de A14 por G. El nombre de la ribozima se muestra a la izquierda; la actividad de escisión a la derecha, (c) motivo Pst3 de grillo. La numeración de los nucleótidos sigue la nomenclatura de Hertel et al., 1992. (d) motivo de la Sm1 de esquistosoma. La Sm1 original carecía del lazo III y no mostraba ninguna actividad en las células. Los nucleótidos descritos en color reflejan los cambios hechos en la Sm1. (e) Los cambios en el tallo I de N79 cerca del núcleo o cerca del sitio de restricción mejoraron aún más la actividad.

La línea negra identifica la secuencia diana de los oligonucleótidos antisentido morfolinados (SEQ ID n.º 67). (f) El acortamiento del tallo I redujo mucho la actividad de escisión de la ribozima. (g) Los cambios en un solo nucleótido del lazo I de la ribozima N107 disminuyeron considerablemente su actividad. La ribozima N107 es una variante de la N79 porque dos 'AUG' se reemplazaron por GUG y ACG para eliminar los posibles codones de inicio. El signo $\pm$ indica la desviación estándar de la media de al menos cuatro mediciones independientes.

Las figuras 2a-2b muestran que, en diferentes células, puede producirse la autoescisión eficaz, con diferentes vectores, y con la secuencias de la ribozima colocadas en diferentes posiciones. (a) La N79 funcionó con eficacia en numerosos tipos de células. Los números son las mediciones de la β -gal expresada. (b) La N79 funcionaba con eficacia en algunas, pero no en todas, las posiciones dentro del vector. Los números son 'veces de disminución' de la expresión de la β -gal (ribozima funcional frente a inactiva). El signo $\pm$ indica la desviación estándar de la media de al menos cuatro mediciones independientes.

Las figuras 3a-3c muestran la inducción de la expresión génica en las células en cultivo por la inhibición de la autoescisión de la ribozima. (a) Efecto del oligonucleótido morfolinado sobre la ribozima N79 en el ensayo de transfección transitoria. La inducción se midió mediante las 'veces de incremento' de la expresión de la β -gal respecto a cuando no se aplica el morfolino. El nivel de inducción también se muestra como un porcentaje respecto al nivel de expresión de la ribozima inactiva. La diana del oligonucleótido se muestra en la figura 1e. (b) Inducción de la expresión de la luciferasa mediante la toyocamicina en una línea celular estable que lleva una construcción de expresión que contiene una ribozima N79 doble. Las células se trataron con toyocamicina durante 24 horas a una dosis de 0, 0,5, 1 y 1,5 μ M (se observaron efectos tóxicos a las concentraciones de más de 1,5 μ M). Las mediciones cuantitativas de la actividad de la luciferasa revelaron la emisión de 1.555, 66.774, 242.546, 377.655 fotones por segundo por 1000 células, respectivamente, en comparación a una emisión de fondo de 121 desde las células que no llevan el gen de la luciferasa. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos cuatro mediciones independientes. (c) Inducción del ARN debida a la toyocamicina según se reveló mediante análisis por transferencia Northern. Las condiciones experimentales eran similares a las de (b). El ARN se purificó del núcleo 'N' o del citoplasma 'C' al cabo de 24 horas de tratamiento.

La figura 4 muestra el control eficaz de la expresión génica *in vivo* mediante el uso del sistema de regulación génica con la ribozima. El panel superior muestra el animal en cuya retina se inyectó el AAV que lleva la N79 inactiva doble y que se trató con toyocamicina. El panel central muestra el animal en cuya retina se inyectó el AAV que lleva la N79 funcional doble y que se trató con adenosina. El panel inferior muestra lo mismo que el panel central, pero tratado con toyocamicina. En el panel inferior se observó una fuerte inducción de la expresión de la luciferasa el día 2. A los animales también se les inyectó el AAV que lleva la N79 inactiva doble en los músculos isquiotibiales de las patas traseras como control interno. La inyección de AAV se hizo 3 semanas antes del día de toma de la primera imagen (día 0). Los microgránulos de liberación del fármaco se implantaron debajo de la piel en el cuello dorsal inmediatamente después de tomar la primera imagen, y estuvieron liberando el fármaco durante 7 días. Los microgránulos de toyocamicina contienen 10 μ g del fármaco; los microgránulos de adenosina, 50 μ g.

Las figuras 5A-5F muestran secuencias de algunos motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma (SEQ ID n.º 13-46), posiciones de estas modificaciones de nucleótidos y su actividad de autoescisión en las células de mamífero. Los cambios de la actividad de la ribozima resultante se midieron siguiendo las veces de diferencia en la actividad de la β -galactosidasa indicadora.

La figura 6 es un diagrama que ilustra la secuencia nucleotídica parcial de un motivo de ARN autoescindible de esquistosoma y los sitios para el lazo III y la modificación del núcleo; SEQ ID n.º 64.

La figura 7 es un diagrama que ilustra la secuencia nucleotídica parcial de un motivo de ARN autoescindible de esquistosoma con un lazo III de cuatro nucleótidos y un sitio para la modificación del núcleo; SEQ ID n.º 65.

La figura 8 muestra la secuencia nucleotídica de un vector de ejemplo denominado HDM-nLacZ; SEQ ID n.º 66.

Las figuras 9A-9B muestran que la 5'-FURidina (A) y el 5'-FURacilo (B) indujeron la expresión génica mediante la inhibición de la autoescisión de la ribozima de una manera dependiente de la dosis.

La figura 2 muestra estructuras de cuatro ribozimas pequeñas: (a) la cabeza de martillo; (b) la horquilla; (c) virus de la hepatitis δ ; y (d) ribozimas de *Neurospora* VS. Las ribozimas en cabeza de martillo (a) están formadas por tres tallos helicoidales denominados I, II y III. La región del núcleo comprende los nucleótidos desapareados. Las estructuras de lazo pueden estar presentes ramificándose desde los tallos I, II y III.

La figura 10 muestra la estructura de cuatro ribozimas pequeñas: (a) la cabeza de martillo; (b) la horquilla; (c) virus de la hepatitis δ ; y (d) ribozimas de *Neurospora* VS. Las ribozimas en cabeza de martillo (a) están formadas por tres tallos helicoidales denominados I, II y III. La región central comprende los nucleótidos desapareados. Las estructuras de lazo pueden estar presentes ramificándose desde los tallos I, II y III.

La figura 11 muestra la estructura secundaria y la secuencia nucleotídica de la ribozima de grillo.

La figura 12 muestra la estructura secundaria y la secuencia nucleotídica de la ribozima de TRSV.

La figura 13 muestra la estructura secundaria y la secuencia nucleotídica de la ribozima de esquistosoma como la que se produce en la naturaleza (tipo silvestre) y la localización de las modificaciones iniciales. Se señalan los tallos I, II y III.

Descripción detallada de la invención

5 Se describen composiciones y procedimientos para controlar la expresión génica con un sistema basado en ribozimas. La terminología «ribozima», tal y como se utiliza en la presente memoria, incluye las ribozimas que se producen en la naturaleza (de tipo silvestre) y las ribozimas modificadas (también denominadas mutantes o variantes). En particular, se describen nuevos motivos de ribozima autoescindible (p. ej., ribozimas de esquistosoma), ácidos nucleicos que codifican al menos un motivo de ribozima autoescindible, reguladores (p. ej.,

10 inhibidores) de los motivos de ribozima autoescindible y los procedimientos que implican los usos de los motivos de las ribozimas y sus reguladores para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Aunque la solicitud trata principalmente de composiciones y procedimientos derivados de una ribozima concreta (ribozima de esquistosoma), el experto en la técnica reconocerá fácilmente que se pueden derivar composiciones y procedimientos similares de cualquier otra ribozima que funcione en las células de mamíferos.

15 También se describen ribozimas autoescindibles que son funcionales en las células de mamíferos. La terminología «ribozima autoescindible funcional» se refiere a una ribozima autoescindible que escinde con eficacia una molécula de ARN en la que está insertada la ribozima y conduce a una reducción de al menos el 90 % (preferiblemente 95%, 98%, 99% o 100%) de la molécula de ARN respecto a una ribozima inactiva. Por ejemplo, la actividad de la ribozima autoescindible se puede ensayar mediante los procedimientos descritos en los ejemplos de trabajo que vienen a

20 continuación.

Como un ejemplo, la ribozima es la ribozima en cabeza de martillo (tipo silvestre o mutantes) seleccionada de ARN+ circular pequeño de cereza (Sc⁺), ARN- circular pequeño de cereza (Sc⁻), virusoide+ del rayado transitorio de la mielga (sLTSV⁺), virusoide- del rayado transitorio de la mielga (sLTSV⁻), ARN+ satélite del virus de las manchas anulares del tabaco (sTRSV⁺), virus del mosaico de las *Arabidopsis* (sArMV), ARN satélite del moteado amarillo de la achicoria (sCYMV), ARN- satélite del virus del enanismo amarillo de la cebada (sBYDV⁻), ARN+ satélite del virus del enanismo de la cebada (sBYDV⁺), ARN+ del virus del mosaico latente del melocotón (PLMVd⁺), ARN- del virus del mosaico latente del melocotón (PLMVd⁻), viroide+ del moteado clorótico del crisantemo (CChMVd⁺), viroide- del moteado clorótico del crisantemo (CChMVd⁻), virusoide del moteado del trébol subterráneo (vSCMoV) y virusoide del moteado del tabaco aterciopelado (vVTMoV).

25

30 Como otro ejemplo, la ribozima es una ribozima en cabeza de martillo (tipo silvestre o mutantes) seleccionada de ARN satélite de *Notophthalmus virdescens* (tritón), *Ambystoma talpoideum* (Am. ta.), *Amphiuma tridactylum* (Am. tr.), ribozima en cabeza de martillo de *Schistosoma mansoni* (esquistozima), ribozima en cabeza de martillo de grillo de *D. baccelli* (grillozima A), ribozima en cabeza de martillo de grillo de *D. schiavazzii* (grillozima B) y viroide+ de la mancha solar del aguacate (ASBV⁺). Un ejemplo específico de secuencia de ribozima es la del grillo cavernícola *Dolichopoda* como se ilustra en la figura 1C (SEQ ID n.º 1).

35

Como otro ejemplo, la ribozima puede ser otra ribozima autoescindible, tal como una ribozima del virus de la hepatitis δ (HDV), una ribozima en horquilla y una ribozima del satélite de *Neurospora varkad* (VS) (véase, p. ej., la figura 10). Al igual que las ribozimas en cabeza de martillo, estas tres ribozimas autoescindibles se encuentran en genomas de ARN vírico, virusoide o satélite, y procesan los productos de la replicación en círculo rodante en hebras con la longitud del genoma (Doherty et al., 2001, *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 30: 457-75; Branch et al., 1984, *Science* 223: 45055).

40

En particular, la invención se refiere a nuevos motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma, ácidos nucleicos que codifican al menos un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma, reguladores (p. ej., inhibidores) de los motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma y procedimientos que implican los

45 usos del motivo mutante de ARN de esquistosoma y sus reguladores para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas.

Motivos mutantes de ARN autoescindibles

Los motivos mutantes de ARN autoescindibles (p. ej., motivos mutantes de esquistosoma) también se denominan ribozimas mutantes o motivos de ribozimas modificadas. Estas ribozimas modificadas se pueden utilizar para modular la expresión de un producto de ácido nucleico deseado en las células. La expresión en las células se

50 modula a través del control de la actividad de un motivo mutante de ARN autoescindible. En particular, la expresión de un producto de ácido nucleico se modula mediante la actividad de un motivo mutante de ARN autoescindible, el cual está localizado en una posición del ARNm de tal manera que el producto de ácido nucleico deseado no se expresa cuando el motivo mutante está activo. En las condiciones que son adecuadas para la expresión del motivo mutante de ARN autoescindible, se escinde el ARNm y, como resultado, no se produce el producto de ácido

55 nucleico deseado que está codificado por el ARNm (figura 1A). La administración a las células de un agente tal como un fármaco u otra molécula o composición, que inhibe o reduce la actividad de escisión del motivo mutante de ARN autoescindible, impide la escisión del ARNm y, por lo tanto, se expresa el producto de ácido nucleico (figura 1A).

Las ribozimas son motivos estructurales de ARN de aproximadamente 40-60 nucleótidos que se puede autoescindir de una manera específica de la secuencia. La terminología «ribozima» se refiere a una secuencia de ARN que se hibrida a una secuencia complementaria en un ARN sustrato y escinde el ARN sustrato de una manera específica de secuencia en un sitio de escisión del sustrato. Típicamente, una ribozima contiene una región catalítica flanqueada por dos regiones de fijación. Las regiones de fijación de la ribozima se hibridan al ARN sustrato, mientras que la región catalítica escinde el ARN sustrato en un sitio de escisión del sustrato para producir un producto de ARN escindido. La secuencia nucleotídica de las regiones de fijación de la ribozima pueden ser completamente complementarias o parcialmente complementarias a la secuencia del ARN sustrato a la cual se fijan las regiones de fijación de la ribozima. Por lo general, las ribozimas se insertan en ADN satélite altamente repetitivo y se han identificado en virus vegetales, tritones, grillos cavernarios y esquistosomas.

Los esquistosomas son una familia de trematodos de la sangre parásitos que infectan a los humanos. Recientemente se encontró que varios miembros de la familia de los esquistosomas codifican ribozimas en cabeza de martillo (Ferbeyre et al., *Mol. Cell Biol.* 18: 3880-3888 (1998)). Las ribozimas en cabeza de martillo son una de las cuatro clases conocidas de motivos de ARN autoescindibles y la terminología se refiere a la estructura secundaria de esta clase de ribozimas. La estructura secundaria de la cabeza de martillo se compone de tres hélices, denominadas tallo I, tallo II y tallo III, unidas en un núcleo central de 11-12 nucleótidos monocatenarios que son necesarios y suficientes para la reacción de autoescisión (Uhlenbeck, *Nature*, 328:596-600 (1987); y Foster y Symons, *Cell*, 50: 9-16 (1987)). Los estudios sistemáticos de mutagénesis específica de sitio han determinado que la mayoría de nucleótidos del núcleo conservado no se pueden mutar sin que haya una pérdida significativa de actividad catalítica (Ruffier et al., *Biochemistry*, 29: 10695-10702 (1990)). Esta observación se utilizó para generar motivos de ARN autoescindibles pero inactivos que se utilizan en la presente memoria como controles negativos en los ensayos de actividad de las ribozimas.

Las ribozimas pueden tener otros elementos estructurales, tales como lazos, que se denominan por el tallo del cual se ramifican. Por ejemplo, las ribozimas de esquistosoma tienen un lazo de seis nucleótidos en el tallo II (lazo II), tal y como se ilustra en la figura 1c. Las ribozimas de esquistosoma (de tipo silvestre) que se producen en la naturaleza incluyen los tallos I-III, lazos I-II, pero no el lazo III. Mediante lazo II se hace referencia a un lazo en el tallo II. Mediante lazo III se hace referencia a un lazo en el tallo III. Otros lazos se identifican de manera similar en la presente memoria mediante esta convención (p. ej., lazo I). En la presente memoria se utiliza la nomenclatura estándar para la posición de los nucleótidos en las ribozimas en cabeza de martillo (Clouet-d'Orval y Uhlenbeck, *Biochemistry*, 36: 9087-9092 (1997)). En algunas realizaciones, la presente invención contempla secuencias que están fuera de la región conservada o de consenso de las ribozimas. Opcionalmente, se pueden incorporar en la estructura de la ribozima las secuencias de fuera de la estructura canónica de la ribozima en cabeza de martillo. Las composiciones resultantes son ejemplos de los motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma de la invención.

Tal y como se describe en la presente memoria, la modificación o alteración de la secuencia nucleotídica de las ribozimas que se producen en la naturaleza (p. ej., ribozima de esquistosoma) puede incrementar o disminuir su actividad catalítica. Tal y como se utiliza en la presente memoria, actividad catalítica se refiere a la capacidad que tiene la ribozima para escindir autocatalíticamente su ARN.

Los motivos mutantes de ARN autoescindibles (p. ej., mutantes de la ribozima de esquistosoma) y los procedimientos descritos son particularmente útiles en el control exógeno de la expresión génica. La presente invención hace posible modular la expresión de un producto de ácido nucleico sin que sea necesario utilizar elementos de control transcripcional especiales ni transactivadores químicos. Así pues, la presente invención tiene una serie de ventajas únicas sobre las metodologías disponibles con anterioridad y tiene aplicaciones amplias en campos tales como la producción de proteínas, la genoterapia y la biología del desarrollo. Además, el elemento genético esencial para la regulación génica es de muy pequeño tamaño y no codifica ningún producto génico. De acuerdo con esto, es poco probable que la introducción del elemento en las células origine algún tipo de toxicidad y debería ser posible incorporar las secuencias necesarias para obtener la expresión regulada en muchos tipos diferentes de vectores.

Un beneficio adicional de los procedimientos descritos en la presente memoria para modular la expresión de un producto de ácido nucleico es que la regulación génica no es sensible a la posición cromosómica, ya que la modulación no depende del control del inicio de la transcripción. Además, a diferencia a los procedimientos existentes para controlar la expresión de un producto de ácido nucleico, que requieren que se utilicen promotores híbridos específicos, es posible modular la expresión de cualquier gen o vector dentro del contexto de los elementos transcripcionales específicos de la etapa de desarrollo o específicos del tipo de célula normal. De hecho, mediante la incorporación del elemento genético esencial para la regulación génica dentro de una unidad transcripcional, es incluso posible proporcionar regulación génica en el contexto de la estructura del ARNm normal utilizada para la expresión génica (p. ej., una estructura desprovista de cualquier elemento regulador exógeno). Estos rasgos pueden resultar ser particularmente importantes para los experimentos con transgénicos y de genosupresión en los animales destinados a valorar la función de un producto génico específico en diferentes etapas de desarrollo, en donde la función esencial de un producto génico en el desarrollo embrionario puede imposibilitar la capacidad para determinar la función del producto génico en una etapa de desarrollo posterior.

En algunos aspectos, la presente invención se refiere a los motivos mutantes de ARN autoescindibles (p. ej., mutantes de la ribozima de esquistosoma) que comprenden modificaciones que modulan o alteran su actividad catalítica. Las modificaciones pueden modular positivamente (incremento) o bien negativamente (disminución) la actividad catalítica del motivo de ARN autoescindible. En una realización particular, las modificaciones pueden modular, bien positivamente o bien negativamente, la capacidad y/o velocidad de autoescisión del motivo de ARN autoescindible. Las modificaciones también pueden carecer de efecto medible sobre la actividad del motivo de ARN autoescindible. Mediante «modificación» se entiende una modificación (p. ej., alternación o cambio) de los elementos estructurales de la ribozima producida en la naturaleza o la adición de otros elementos estructurales que no aparecen en la ribozima producida en la naturaleza. La terminología «modificación» se entiende que incluye adiciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos de la secuencia del motivo de ARN autoescindible o de las secuencias adyacentes que comprenden el motivo de ARN autoescindible. Las modificaciones incluyen la adición (p. ej., mediante inserto) de estructuras de tallo y/o lazo a una ribozima producida en la naturaleza y la modificación de las estructuras de tallo y/o lazo de una ribozima producida en la naturaleza. Las modificaciones también incluyen la adición de uno o más (varios) aptámeros a un motivo de ARN autoescindible y la adición de otros rasgos estructurales a un motivo de ARN autoescindible, tales como horquillas. Estas modificaciones se pueden utilizar por separado o en combinación con una o varias modificaciones y se entiende que no son limitantes de ninguna manera.

También se describe un motivo de ARN autoescindible de esquistosoma que está modificado para incluir un lazo o tallo III. Un «lazo», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una estructura secundaria en una secuencia de ARN en la que una secuencia de ARN monocatenario está flanqueada por secuencias de ARN que son capaces de aparearse entre sí para formar una estructura de «tallo». Un lazo comprende al menos tres nucleótidos, y preferiblemente de aproximadamente 3 a 40 nucleótidos. Un «lazo» puede incluir nucleótidos que se pueden aparear con otras bases y dar lugar a estructuras que no son un lazo. Por ejemplo, un lazo puede incluir nucleótidos que se pueden aparear y, opcionalmente, puede alargar el tallo desde el cual se ramifica. Con «ramas» se entiende que la secuencia nucleotídica de la modificación comienza en donde el tallo originalmente terminó. Mediante «aparear las bases» se entiende la formación de uno o varios puentes de hidrógeno entre dos secuencias de ácido nucleico mediante el tipo de interacción tradicional de Watson-Crick u otros tipos no tradicionales (por ejemplo, de tipo Hoogsteen). Un motivo de ARN autoescindible de esquistosoma que incluye un lazo en el tallo III es un ejemplo de un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma de la invención. Preferiblemente, la actividad catalítica de tal motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma que comprende un lazo en el tallo III es mayor que la actividad catalítica del correspondiente motivo de ARN autoescindible de esquistosoma como el que se produce en la naturaleza.

En una realización concreta, un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma de la invención comprende un lazo III de cuatro nucleótidos. En una realización concreta, el lazo comprende 5'-UUCG-3'. En la figura 1e se ilustra un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma de ejemplo (N99). La presente invención también da a conocer en la figura 5 otros motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma y sus secuencias (SEQ ID n.º 13-63).

En otra realización, un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma comprende un lazo III de seis u ocho nucleótidos que también alarga el tallo III. En la figura 5 se ilustran ejemplos de motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma que comprenden un lazo III de seis nucleótidos (p. ej., N27 y N53). En la figura 5 también se ilustran ejemplos de motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma que comprenden un lazo III de ocho nucleótidos (p. ej., N73, N79, N99 y N117).

Los motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma pueden incluir también sustituciones en la posición 5, 7 y/o 14 (p. ej., C → U en el núcleo, como se ilustra en las figuras 1 y 5). En una realización concreta, un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma de la invención comprende un lazo III y una sustitución en el núcleo central conservado. En una realización preferida, el lazo III comprende 5'-UUCG-3' y una U en la posición 7 del núcleo central, como se ilustra en las figuras 1 y 5 (p. ej., N53, N73, N79, N99 y N117). En otra realización, un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma comprende una adición de seis nucleótidos en el extremo del tallo III y una U en la posición 7 del núcleo central, tal y como se ilustra en las figuras 1 y 5.

En determinadas realizaciones, la presente invención también se refiere a otros motivos de ARN autoescindibles de esquistosoma ilustrados en la figura 5 (SEQ ID n.º 13-63).

La terminología «sustitución», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a uno o más de uno (uno o muchos) cambios de nucleótidos en el motivo de ARN autoescindible como el que se produce en la naturaleza. La terminología «motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma» se refiere a un motivo de ARN autoescindible de esquistosoma que comprende al menos una alteración de nucleótido en comparación con una ribozima de esquistosoma como la que se produce en la naturaleza (de tipo silvestre) (p. ej., Sm1) tal y como se describe en la figura 1d (Ferbeyre et al., *Mol. Cell Biol.*, 18: 3880-3888 (1998)). Los procedimientos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para identificar cualquier motivo mutante de ribozima autoescindible (p. ej., motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma con alteración de las propiedades catalíticas). Los procedimientos para ensayar la actividad catalítica se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, los motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma se pueden incubar en las condiciones adecuadas para la escisión, se puede fraccionar mediante electroforesis en gel, y la magnitud de la escisión se puede cuantificar mediante

autorradiografía. Los procedimientos para cuantificar la actividad catalítica de los motivos mutantes de ARN autoescindibles de esquistosoma de la invención se conocen bien en la técnica e incluyen el uso de un gen indicador, tal como, por ejemplo, como se describe en la presente memoria en el ejemplo 1.

Vectores de expresión y líneas celulares

5 En algunas realizaciones, la presente invención abarca ácidos nucleicos (p. ej., vectores de ADN) que codifican una ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma) y su uso para modular la expresión de un producto de ácido nucleico. También se describen procedimientos para insertar la secuencia del motivo mutante de ARN autoescindible en un gen endógeno en una célula, o en un gen exógeno que se va a introducir en una célula mediante un vector. En cualquier caso, están presentes los elementos necesarios (p. ej., promotores) para la transcripción de la secuencia insertada. Por ejemplo, una ribozima autoescindible se inserta en un vector de expresión adecuado que contiene los elementos necesarios para la transcripción de la secuencia insertada. A continuación, el vector de expresión se introduce por transfección en una célula hospedadora para efectuar la expresión de la secuencia que codifica la ribozima y para determinar su efecto sobre la función génica en la célula transfectada y/o su descendencia.

15 En una realización, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (p. ej., una construcción de ADN) que comprende un promotor, el ADN que codifica un producto de ácido nucleico operativamente unido al promotor, y el ADN que codifica una ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como los mutantes de la ribozima de esquistosoma) que se encuentra después del promotor. La transcripción de los dos componentes de ADN en la construcción produce una molécula de ARN que comprende la ribozima autoescindible y el ARNm que codifica el producto de ácido nucleico, y la ribozima autoescindible puede escindir el ARN de forma intramolecular.

En otra realización, la presente invención se refiere a un vector vírico que comprende un promotor, un ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico operativamente unido al promotor y un ácido nucleico que codifica una ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma) que se encuentra después del promotor. La transcripción de los dos componentes de ácido nucleico en el vector vírico produce una molécula de ARN que comprende una ribozima autoescindible y el ARNm que codifica el producto de ácido nucleico, y la ribozima autoescindible puede escindir el ARN de forma intramolecular. En otra realización, la presente invención se refiere a un virus que comprende un promotor, una secuencia nucleotídica que codifica un producto de ácido nucleico operativamente unido al promotor y una secuencia nucleotídica que codifica una ribozima autoescindible que se encuentra cadena abajo del promotor. La transcripción de las dos secuencias nucleotídicas en el virus produce una molécula de ARN que comprende una ribozima autoescindible y el ARNm que codifica el producto de ácido nucleico, y la ribozima autoescindible puede escindir el ARN de forma intramolecular.

Las construcciones de ADN que codifican una ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma) de la presente invención se pueden fabricar de acuerdo con los procedimientos que se conocen por lo general en la técnica. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican una ribozima autoescindible se pueden fabricar mediante síntesis química o tecnología de ADN/ARN recombinante (véase, p. ej., Sambrook et al., Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York (1989); y Ausubel et al., Eds., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1997)).

En algunas realizaciones, la presente invención da a conocer un kit para regular la expresión génica. El kit en cuestión comprende un ácido nucleico que comprende: (a) una ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma); y (b) un sitio de clonación para introducir una secuencia nucleotídica deseada que hay que transcribir operativamente unida a la ribozima autoescindible. Opcionalmente, el kit puede comprender además un inhibidor de la ribozima autoescindible. La transcripción de la secuencia nucleotídica deseada está inhibida en ausencia del inhibidor, mientras la transcripción de la secuencia nucleotídica deseada está inducida en presencia del inhibidor. Por ejemplo, un mutante de la ribozima de esquistosoma comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de las SEQ ID n.º 1-63. El inhibidor del kit incluye, tal y como se describe a continuación, pero sin limitarse a ellos, toyocamicina, 8-azaadenosina, sangivamicina, tubercidina, monofosfato cíclico de tubercidina, monofosfato de tubercidina, trifosfato de tubercidina, nebularina, nucleósido tricíclico, 5-fluorouridina, 5-bromouridina, 5-fluorouracilo, Syto-83, bromuro de etidio y naranja de acridina.

Otro aspecto se refiere a un procedimiento para modular la expresión de un producto de ácido nucleico que comprende la producción de un ácido nucleico que codifica una ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma), tal y como se describe en la presente memoria, y un producto de ácido nucleico, en donde la ribozima autoescindible modula la expresión del producto de ácido nucleico. El producto de ácido nucleico puede ser un polipéptido, ADN o ARN diferente al ARN autoescindible y se puede expresar en las células como un componente de una construcción de ADN. El producto de ácido nucleico a expresar puede ser una proteína terapéutica.

Es deseable que la ribozima en cuestión (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma) se autoescinda lo suficientemente, de tal manera que no se exprese el producto de ácido nucleico deseado. Tal autoescisión sustancial facilitaría la observación del efecto de agotamiento de la función génica en el organismo. Aunque deseable, no se necesita la autoescisión completa de la ribozima por los procedimientos de la invención, con la condición de que la ribozima dé lugar a poca cantidad de un producto de ácido nucleico deseado respecto a un control. La terminología «poca cantidad de un producto de ácido nucleico deseado respecto a un control» se refiere a una cantidad de un producto de ácido nucleico deseado que está por debajo de, preferiblemente, al menos el 20%, por debajo de, más preferiblemente, al menos el 50%, por debajo de, aún más preferiblemente, al menos el 90% de la cantidad de un producto de ácido nucleico deseado en un control (p. ej., una muestra correspondiente en ausencia de la ribozima o en presencia de una ribozima que es incapaz de autoescindirse) y lo más preferiblemente se encuentra en el nivel de fondo, o es indetectable, mediante hibridación por transferencia Northern tal y como se describe en la presente memoria. El procedimiento no requiere, y no se limita a ellos, los procedimientos en los que un producto de ácido nucleico deseado desaparece al 99% o al 100%.

En otra realización, un procedimiento para modular la expresión de un producto de ácido nucleico en una célula comprende introducir en una célula una construcción de ADN que comprende: (a) un promotor, (b) un ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico operativamente unido al promotor y (c) un ácido nucleico que codifica una ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma) que se encuentra después del promotor. La transcripción de los componentes del ácido nucleico produce una molécula de ARN (ARNm) que comprende la ribozima autoescindible y el ARNm que codifica el producto de ácido nucleico, de tal manera que la ribozima autoescindible escinde el ARN de forma intramolecular, y así modula la expresión del producto de ácido nucleico.

Si la construcción de ADN está presente en las células en las condiciones que permiten la expresión de los dos componentes nucleotídicos, se produce la molécula de ARNm que comprende la ribozima autoescindible y el ARNm que codifica el producto de ácido nucleico, se escinde espontáneamente la ribozima autoescindible codificada y, como resultado, no se produce el producto de ácido nucleico. Por otra parte, si la construcción de ADN está presente en las células en presencia de un agente, tal como un fármaco (p. ej., un antibiótico) que inhibe (total o parcialmente) la actividad de escisión de la ribozima autoescindible codificada, se produce el producto de ácido nucleico deseado.

La presente invención también abarca otros elementos estructurales que pueden afectar a la estabilidad y/o la actividad de la ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma), bien positiva o negativamente. Por ejemplo, se ha determinado que las secuencias de ARN adyacentes al sitio catalítico de la ribozima autoescindible afectan a su actividad de escisión. La actividad de escisión de la ribozima autoescindible se puede modular mediante la fijación de un efector a una secuencia de aptámero que se inserta en la ribozima autoescindible en una posición de tal manera que la actividad de escisión se puede controlar mediante la fijación del efector al aptámero.

De igual forma, el objeto de la presente invención es una construcción de ADN útil en el presente procedimiento para controlar la expresión de un producto de ácido nucleico deseado en una célula. En una realización, la construcción de ADN comprende: (a) ADN que codifica un producto de ácido nucleico a expresar en la célula; y (b) ADN que codifica una ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma). La transcripción de los dos componentes de ADN en la construcción produce un ARNm que comprende la ribozima autoescindible y el ARNm que codifica el producto de ácido nucleico a expresar. Los componentes de la construcción se pueden separar mediante la interposición de ADN, tal como un conector, siempre y cuando el ADN interpuesto no interfiera con la capacidad de la actividad de escisión de la ribozima autoescindible codificada para alterar (escindir) el ARNm que codifica el producto de ácido nucleico deseado, con lo que se inhibe/bloquea la expresión del producto de ácido nucleico deseado. Esta realización de la construcción del ADN se puede introducir en un receptor/células hospedadoras adecuados de tal manera que la construcción se integra en el ADN genómico de la célula hospedadora en una posición que da lugar a que quede operativamente unido a un promotor de la célula hospedadora (ADN suficiente para iniciar la transcripción) y, como resultado, se exprese bajo el control de la maquinaria de la célula hospedadora. Si la célula hospedadora se mantiene en las condiciones adecuadas para la expresión del ADN en la célula hospedadora (que incluye la expresión del ADN de la construcción de ADN introducida y ahora integrada), el producto de ácido nucleico deseado codificado no se expresa porque se produce la ribozima autoescindible y su actividad da lugar a la alteración del transcrito (ARNm) resultante, que no se puede posteriormente traducir. Como resultado, no se expresa el producto de ácido nucleico codificado. Si la célula hospedadora que contiene la construcción de ADN de esta realización se mantiene en las condiciones adecuadas para la expresión del ADN en la célula hospedadora y en presencia de un agente tal como un antibiótico (que impide la actividad de la ribozima autoescindible codificada), no se produce la alteración del transcrito resultante y se expresa el producto de ácido nucleico deseado. En esta realización, en la que la construcción del ADN se integra en el ADN genómico de la célula hospedadora, la construcción puede comprender ADN adicional que incrementa la magnitud a la cual la construcción de ADN se integra en el ADN genómico de la célula hospedadora y/o actúa selectivamente o dirige la introducción de la construcción en una posición específica del genoma. La construcción de esta realización puede también incluir otros componentes, tales como un potenciador y sitios de fijación transcripcionales.

En una realización alternativa, la construcción de ADN comprende además suficiente ADN para el inicio de la transcripción (tal como un promotor) unido operativamente al ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado. En una realización concreta, el ADN que codifica la ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma) está en 5' del ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado. Así pues, el orden de los componentes en la construcción (de 5' a 3') es: promotor - ADN que codifica la ribozima autoescindible - ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado. En una segunda realización, el ADN que codifica la ribozima autoescindible está en 3' del ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado. Así pues, el orden de los componentes en la construcción (de 5' a 3') es: promotor - ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado - ADN que codifica la ribozima autoescindible.

En algunos aspectos, la construcción de ADN de la invención comprende un promotor que incluye, pero sin limitarse a ellos, promotor de tRNA, promotores del rRNA 5S, promotores de los genes de las histonas, promotor del CMV, promotor del RSV, promotor del SV40, promotor de la PEPCK, promotor del MT, promotor de SR α , promotores de la familia del P450, promotor de GAL7, promotor de T7, promotor de T3, promotor de SP6 y promotor de K11. El promotor de T7, el promotor de T3, el promotor de SP6 y el promotor de K11 se han descrito en la patente de los EE.UU. n.º 5.591.601, cuyo contenido completo se incorpora por referencia.

La invención se refiere a líneas celulares de empaquetamiento útiles para generar vectores víricos recombinantes y virus que comprenden un genoma recombinante que incluyen una secuencia nucleotídica (ARN o ADN) que representa una construcción de ADN de la presente invención; construcción de tales líneas celulares; y los procedimientos para utilizar los vectores víricos recombinantes para modular la producción *in vitro* y *ex vivo* de un producto de ácido nucleico deseado. En una realización concreta, los vectores víricos recombinantes y virus comprenden un genoma recombinante que incluyen una secuencia nucleotídica que codifica una ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma), una secuencia nucleotídica que codifica un producto de ácido nucleico y un promotor unido operativamente a la secuencia nucleotídica que codifica el producto de ácido nucleico deseado, como se describe en la presente memoria.

Las líneas celulares útiles para generar vectores víricos recombinantes y virus que comprenden un genoma recombinante que incluyen una secuencia nucleotídica que representa una construcción de ADN de la presente invención se producen mediante la transfección de las células hospedadoras, tales como células hospedadoras de mamífero, con un vector vírico que incluye la construcción de ADN integrada en el genoma del virus, según se describe en la presente memoria. Se recogen reservas de virus de acuerdo con los procedimientos que se conocen por lo general en la técnica. Véase, p. ej., Ausubel et al., Eds., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1998); Sambrook et al., Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York (1989); Danos y Mulligan, patente de los EE.UU. n.º 5.449.614; y Mulligan y Wilson, patente de los EE.UU. n.º 5.460.959, cuyas enseñanzas se incorporan en la presente memoria por referencia. Los vectores víricos recombinantes producidos por las líneas celulares de empaquetamiento de la presente invención también se denominan en la presente memoria vectores víricos que representan la construcción de ADN.

Procedimientos para introducir los ácidos nucleicos

Las construcciones de ADN que codifican la ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como los mutantes de la ribozima de esquistosoma) se pueden introducir en una célula mediante una serie de procedimientos (p. ej., transformación, transfección, captación directa, bombardeo de proyectiles, con el uso de liposomas). La presente invención contempla cualesquiera procedimientos conocidos por lo general en la técnica que son adecuados para los agente o efector y tipo celular concretos. Por ejemplo, los agentes y los efectores se pueden introducir en una célula mediante captación directa, DEAE-dextrano, precipitación con fosfato de calcio, lipofección, fusión celular, electroporación, biolística, microinyección, inyección (p. ej., mediante virus de ADN y virus de ARN) y transducción mediada por retrovirus. Dichos métodos se describen con más detalle, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York (1989); y Ausubel et al., Eds., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1998). Otros procedimientos adecuados también se describen en la técnica.

Un vector que comprende una construcción de ADN también se puede introducir en una célula dirigiendo el vector a los fosfolípidos de la membrana celular. Por ejemplo, la acción selectiva de un vector de la presente invención se puede llevar a cabo uniendo la molécula del vector a una proteína VSV-G, una proteína vírica con afinidad por todos los fosfolípidos de la membrana celular. Tal construcción se puede producir con los procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización particular, una construcción de ADN que codifica una ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma) se inserta en un vector de ácido nucleico, p. ej., un plásmido de ADN, virus u otro replicón adecuado (p. ej., vector vírico). Los vectores víricos incluyen retrovirus, adenovirus, parvovirus (p. ej., virus adenoasociados), coronavirus, virus de ARN de hebra negativa tales como ortomixovirus (p. ej., virus de la gripe), rabdovirus (p. ej., virus de la rabia y de la estomatitis vesicular), paramixovirus (p. ej., virus del sarampión y Sendai), virus de ARN de hebra positiva tales como

picornavirus y alfavirus y virus de ADN bicatenario que incluyen adenovirus, virus del herpes (p. ej., virus del herpes simple de tipo 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus) y virus de la viruela (virus de la variolovacuna, virus de la difteroviruela aviar y virus de la viruela del canario). Otros virus incluyen virus de Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus y virus de la hepatitis, por ejemplo. Ejemplos de retrovirus incluyen: leucosis-sarcoma aviar, virus de mamífero de tipo C, virus de tipo B, virus de tipo D, grupo HTLV-BLV, lentivirus, espumavirus (Coffin, J. M., «Retroviridae: The viruses and their replication», *In Fundamental Virology*, tercera edición, B. N. Fields et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, 1996). Otros ejemplos incluyen los virus de la leucemia murina, virus del sarcoma murino, virus del tumor de mama de ratón, virus de la leucemia bovina, virus de la leucemia felina, virus del sarcoma felino, virus de la leucemia aviar, virus de la leucemia de los linfocitos T humanos, virus endógeno del babuino, virus de la leucemia del mono gibón, virus del mono Mason Pfizer, virus de la inmunodeficiencia del simio, virus del sarcoma del simio, virus del sarcoma de Rous y lentivirus. Otros ejemplos de vectores se describen, por ejemplo, en McVey et al., patente de los EE.UU. n.º 5.801.030.

Como un ejemplo concreto de la estrategia anterior, se puede integrar una construcción de ADN de la invención en el genoma de un virus que entra en la célula. Mediante infección de la célula, se introducen en la célula los componentes de un sistema que permite la expresión del ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado y la escisión espontánea del ARNm correspondiente. En las condiciones adecuadas se produce la escisión espontánea del ARNm correspondiente y se inhibe la expresión del producto codificado.

Al mantener las células transfectadas en las condiciones adecuadas para la producción de virus se generan las reservas de virus que consisten en vectores víricos recombinantes que comprenden un genoma recombinante que incluye una secuencia nucleotídica (ADN o ARN) que representa una construcción de ADN de la presente invención. Tales condiciones, que no son decisivas para la invención, se conocen bien por lo general en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York (1989); Ausubel et al., Eds., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1998); patente de los EE.UU. n.º 5.449.614; y la patente de los EE.UU. n.º 5.460.959.

Los vectores víricos recombinantes resultantes se pueden utilizar, como se describe en la presente memoria, para modular la producción *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* de un producto de ácido nucleico deseado.

Así pues, la invención también se refiere a vectores víricos recombinantes y virus que comprenden un genoma recombinante que incluyen una secuencia nucleotídica (ARN o ADN) que representa una construcción de ADN de la presente invención. Los vectores víricos y los virus que comprenden las construcciones de ADN o el ARN codificado (retrotranscrito) también son el objeto de la presente invención.

En algunas realizaciones, la presente invención contempla un procedimiento para inhibir la expresión de un producto de ácido nucleico en las células hospedadoras, que comprende introducir una ribozima autoescindible sola (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma) dentro de las células. Las células que comprenden el motivo mutante de ARN se cultivan en las condiciones adecuadas para que el motivo mutante de ARN se aparee con el ARNm que codifica el producto de ácido nucleico y lo escinda. La secuencia de la ribozima autoescindible se puede producir mediante los procedimientos sintéticos químicos o mediante técnicas de ácidos nucleicos recombinantes. Por ejemplo, la ARN polimerasa clonada se puede utilizar para la transcripción *in vitro*. La secuencia de la ribozima autoescindible producida se puede hacer que incluya modificaciones bien en el esqueleto de fosfatos y azúcares, o bien en el nucleósido, p. ej., para reducir la sensibilidad a las nucleasas celulares, mejorar la biodisponibilidad, mejorar las características de formulación y/o cambiar otras propiedades farmacocinéticas. La secuencia de la ribozima autoescindible se puede producir enzimáticamente o mediante síntesis orgánica parcial o total, y se puede introducir cualquier ribonucleótido modificado mediante síntesis enzimática u orgánica *in vitro*. A continuación, la secuencia de la ribozima autoescindible se puede introducir en las células mediante los procedimientos convencionales descritos más arriba que se utilizan sistemáticamente para introducir ácidos nucleicos.

Procedimientos para identificar reguladores de las ribozimas

La presente invención se refiere a un procedimiento para escrutar en busca de un agente que es capaz de inhibir la actividad catalítica de una ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como los mutantes de la ribozima de esquistosoma). En una realización de este procedimiento, en las células hospedadoras se introduce una construcción de ADN que comprende: (1) ADN que codifica un indicador, (2) un promotor operativamente unido al ADN que codifica el indicador y (3) ADN que codifica una ribozima autoescindible, en donde el ADN de (1) y el ADN de (3) están después del promotor, y la transcripción del ADN de (1) y del ADN de (2) produce un ARNm que comprende la ribozima autoescindible y el ARNm que codifica el indicador. Las células hospedadoras se ponen en contacto con un agente para valorarles su capacidad para inhibir la actividad catalítica de la ribozima autoescindible en las condiciones adecuadas para la expresión del indicador, y la actividad del indicador se ensaya en las células hospedadoras. Si se detecta la actividad del indicador, no se escinde el ARNm que codifica el indicador, lo que indica que la actividad catalítica de la ribozima autoescindible se ve inhibida por el agente.

La terminología «indicador» se refiere a una proteína o polipéptido cuya actividad se puede ensayar con facilidad y rapidez mediante las técnicas estándares. Ejemplos de indicadores incluyen enzimas, tales como β -galactosidasa, β -glucoronidasa, β -glucosidasa, cloranfenicol acetil transferasa (CAT) bacteriana, moléculas luminiscentes, tales como la proteína fluorescente verde y la luciferasa de la luciérnaga, y marcadores auxótrofos tales como His3p y Ura3p. Véase, p. ej., Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulo 9, John Wiley & Sons, Inc. (1998).

La presente invención también se refiere a un procedimiento para escrutar un efector que se fija al aptámero (o secuencia de ARN) deseado. En una realización de este procedimiento, en las células hospedadoras se introduce una construcción de ADN que representa la construcción de ADN, en donde la construcción de ADN comprende: (1) ADN que codifica un indicador, (2) un promotor operativamente unido al ADN que codifica el indicador y (3) ADN que codifica una ribozima autoescindible que comprende un aptámero (o secuencia de ARN) deseado insertado en una posición de tal forma que la actividad de escisión de la ribozima autoescindible es regulable por la fijación de un efector al aptámero (o secuencia de ARN), en donde el ADN de (1) y el ADN de (3) están después del promotor, y la transcripción del ADN de (1) y del ADN de (3) produce un ARNm que comprende aptámero-ribozima autoescindible (o secuencia de ARN-ribozima autoescindible) y el ARNm que codifica el indicador. Las células hospedadoras se ponen en contacto con un agente para valorarles su capacidad para fijarse al aptámero (o secuencia de ARN) en las condiciones adecuadas para la expresión del indicador y la actividad del indicador se ensaya en las células hospedadoras. Si el agente se fija al aptámero (o secuencia de ARN), se inhibe la actividad de escisión del motivo de ARN autoescindible y, como resultado, no se escinde el ARNm que codifica el indicador y se produce el indicador. Por lo tanto, si se detecta la actividad del indicador, se identifica el agente como un efector que se fija al aptámero (o secuencia de ARN) deseado.

La invención también se refiere a un procedimiento para escrutar en busca de un agente que es capaz de inhibir la actividad catalítica de una ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma) que incluye una secuencia aleatoria en una posición de la ribozima autoescindible capaz de modular la actividad de escisión de la ribozima autoescindible que comprende: (a) introducir en las células hospedadoras una construcción de ADN que representa la construcción de ADN, en donde la construcción de ADN comprende: (1) un promotor; (2) ADN que codifica un indicador operativamente unido al promotor; y (3) ADN que codifica una ribozima autoescindible modificada para que incluya una secuencia aleatoria en una posición de la ribozima autoescindible capaz de modular la actividad de escisión del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma, en donde el ADN de (2) y el ADN de (3) se encuentran después del promotor, y la transcripción del ADN de (2) y del ADN de (3) produce un ARNm que comprende la ribozima autoescindible que incluye la secuencia aleatoria y el ARNm que codifica el indicador; (b) poner en contacto las células hospedadoras con un agente a evaluar por su capacidad para inhibir la actividad catalítica de la ribozima autoescindible, que incluye la secuencia aleatoria en las condiciones adecuadas para la expresión del indicador; y (c) ensayar la actividad del indicador en las células hospedadoras. Si se detecta la actividad del indicador, no se escinde el ARNm que codifica el indicador, lo que indica que el agente inhibe la actividad catalítica de la ribozima autoescindible que incluye la secuencia aleatoria.

Agentes, tales como fármacos, compuestos químicos, compuestos iónicos, compuestos orgánicos, ligandos orgánicos, entre ellos cofactores, sacáridos, péptidos, proteínas y peptoides recombinantes y sintéticos, y otras moléculas y composiciones se puede escrutar por separado o se pueden ensayar simultáneamente uno o varios agentes por su capacidad para modular la actividad de escisión de una ribozima autoescindible o por la capacidad para fijarse a un aptámero de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria. Cuando se analiza una mezcla de los agentes, los agentes seleccionados mediante los métodos descritos se pueden separar e identificar mediante los procedimientos adecuados (p. ej., PCR, secuenciación, cromatografía). De acuerdo con estos métodos se puede determinar que uno o varios agentes de una muestra problema modulan la actividad de escisión de una ribozima autoescindible. De igual forma, también se pueden determinar los agentes de una muestra problema que se fijan a un resto de aptámero.

Se pueden analizar grandes colecciones combinatorias de agentes (p. ej., compuestos orgánicos, péptidos recombinantes o sintéticos, peptoides, ácidos nucleicos) producidos mediante síntesis química combinatoria u otros procedimientos (véase, p. ej., Zuckerman, R. N. et al., *J. Med. Chem.*, 37: 2678-2685 (1994) y la bibliografía citada en ella; véase también, Ohlmeyer, M. H. J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10922-10926 (1993) y DeWitt, S. H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6909-6913 (1993), que se refieren a compuestos etiquetados; Rutter, W. J. et al. patente de los EE.UU. n.º 5.010.175; Huebner, V. D. et al., patente de los EE.UU. n.º 5.182.366; y Geysen, H. M., patente de los EE.UU. n.º 4.833.092).

Cuando los agentes seleccionados de una colección combinatoria llevan etiquetas únicas, se puede identificar cada uno de los agentes mediante procedimientos cromatográficos. Además, se pueden analizar (escrutar) colecciones de sustancias químicas, caldos microbianos y genotecas de visualización en fagos de acuerdo con los procedimientos de la presente memoria.

En otra realización, la actividad de escisión de una ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma) se puede inhibir (parcial o totalmente) con el uso de un agente tal como un fármaco (p. ej., un antibiótico) u otra molécula o composición, que inhibe (parcial o

totalmente) la actividad de escisión de la ribozima autoescindible. La inhibición de la escisión espontánea del correspondiente ARNm da lugar a una inducción eficaz de la expresión del producto de ácido nucleico de interés. Los antibióticos que se pueden utilizar para inhibir la actividad de escisión de una ribozima autoescindible incluyen antibióticos aminoglucósidos tales como, pero sin limitarse a ellos, neomicina B, sulfato de neomicina, adriamicina RDF[®], doxorubicina, bisbencimida, quelocardina, acetato de diminaceno, ribostamicina, paromomicina, neamina, gentamicina, complejo de gentamicina C, sulfato de gentamicina C1A, sulfato de gentamicina, hidrocloreuro de gramicidina S, lincomicina, kanamicina, tobramicina, tuberactinomicina A, tuberactinomicina B, 6'-amino-6'-desoxikanamicina y 5'-epi-sisomicina; tetraciclinas y sus derivados y análogos, tales como, pero sin limitarse a ellos, tetraciclina, clortetraciclina, demeclociclina, quelocardina y 4-epi-anidrohdroclortetraciclina; antibióticos peptídicos, tales como, pero sin limitarse a ellos, viomicina, di-β-lisil-capreomicina IIA y tuberactinomicina A; y antibióticos de pseudodisacáridos, tales como, pero sin limitarse a ellos, 2'-des-N-1-β-lisillisinomicina, 3-epi-6'-des-C-metilfortimicina B y 3-epi-2'-N-1-β-lisil-6'-de-C-metilfortimicina B. Otros antibióticos que se pueden utilizar para inhibir la actividad de escisión de una ribozima autoescindible se conocen y se describen en la técnica. Véase, por ejemplo, Stage et al., *RNA*, 1: 95-101 (1995); Cloeut-d'Orval et al., *Biochem.*, 34: 11186-11190 (1995); Murray y Arnold, *Biochem. J.*, 317: 855-860 (1996); Hermann y Westhof, *J. Mol. Biol.*, 276: 903-912 (1998); y Rogers et al., *J. Mol. Biol.*, 259: 916-925 (1996).

En algunas realizaciones específicas, los inhibidores de una ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma) incluyen, pero sin limitarse a ellos, oligonucleótidos antisentido de la ribozima y cualquier forma modificada de los oligonucleótidos antisentido. Por ejemplo, un oligonucleótido antisentido aparea sus bases con una región del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma como se describe en la figura 1e. Como resultado, la actividad de la ribozima autoescindible queda inhibida (parcial o totalmente) por el oligonucleótido antisentido. En algunos casos, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido modificado seleccionado del grupo que consiste en: morfolino, fosforotioato de ARN, ARN 2'-O-metilado, y fosforotioato de ARN 2'-O-metoxetilado.

En otras realizaciones específicas, los inhibidores de una ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma) incluyen, pero sin limitarse a ellos, los compuestos recogidos en la tabla 2, tales como toyocamicina, 5-fluorouridina y 5-fluorouracilo.

En algunas realizaciones, la presente invención contempla un procedimiento para determinar el nivel de un inhibidor de una ribozima (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como los mutantes de la ribozima de esquistosoma) en una muestra biológica. La terminología «determinar» se utiliza en la presente memoria para referirse a cualquier procedimiento de observación de un inhibidor en una muestra biológica, tanto si el inhibidor se detecta realmente o no. La determinación del nivel de un inhibidor puede ser una observación cuantitativa, semicuantitativa o no cuantitativa. Tales procedimientos se pueden utilizar para determinar un inhibidor que está presente en una célula o en una muestra biológica. Los inhibidores de ejemplo incluyen 5-fluorouracilo y 5-fluorouridina. Tal y como se utiliza en la presente memoria, los compuestos de 5-FU incluyen 5-fluorouracilo y sus metabolitos derivados tales como 5-fluorouridina.

El 5-fluorouracilo se utiliza extensamente para el tratamiento de un gran abanico de tumores y según diferentes pautas. Algunos estudios han demostrado que existe una relación entre la concentración en el plasma del 5-fluorouracilo y los efectos tóxicos y terapéuticos del tratamiento en diferentes tipos de tumores (Beerblock et al., 1997, *Cancer* 79: 1100; Trump et al., 1991, *J. Clin. Oncol.* 11: 2027; Gamelin et al., 1996, *Cancer* 77: 441; Gamelin et al., 1998, *J. Clin. Oncol.* 16: 1470; Milano et al., 1994, *J. Clin. Oncol.* 12: 1291). Estos hallazgos fueron la base para determinar un intervalo terapéutico para el compuesto 5-FU, que es esencial para el ajuste individual de la dosis del compuesto. Por ejemplo, por medio de la dosis individual basada en las concentraciones de 5-FU, Gamelin et al. alcanzaron un porcentaje de respuestas objetivas del 56 % (Gamelin et al., 1998, *J. Clin. Oncol.* 16: 1470), mientras este valor era aproximadamente el 15 % para el 5-FU en monoterapia.

En una realización específica, un procedimiento para determinar el nivel del compuesto 5-FU en una célula comprende:

(a) introducir en una célula una construcción de ADN que comprende: (1) un promotor; (2) ácido nucleico que codifica un indicador; y (3) ácido nucleico que codifica una ribozima (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como los mutantes de la ribozima de esquistosoma), en donde el ácido nucleico de (2) y el ácido nucleico de (3) están después del promotor y operativamente unidos a dicho promotor, en las condiciones que dan lugar a la inhibición de la ribozima y a la expresión del indicador; y

(b) ensayar la actividad del indicador en la célula producida por (a),

en donde la cantidad de dicho compuesto 5-FU en la célula se identifica por comparación de la actividad del indicador con un control adecuado.

En otra realización específica, el procedimiento para determinar el nivel del compuesto 5-FU en una muestra biológica comprende:

(a) poner en contacto una célula con una muestra biológica, en donde la célula expresa una construcción de ADN que comprende: (1) un promotor; (2) un ácido nucleico que codifica un indicador; y (3) un ácido nucleico que codifica una ribozima (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como los mutantes de la ribozima de esquistosoma), en donde el ácido nucleico de (2) y el ácido nucleico de (3) están después del promotor y operativamente unidos a dicho promotor, en las condiciones que dan lugar a la inhibición de la ribozima y a la expresión del indicador; y

(b) ensayar la actividad del indicador en presencia de una muestra biológica,

en donde la cantidad del compuesto 5-FU en la muestra biológica se identifica al comparar la actividad del indicador con un control adecuado.

Tal y como se describe en los ejemplos de trabajo, los solicitantes han hallado que los compuestos 5-FU inhibían la actividad de una ribozima (p. ej., un mutante de la ribozima autoescindible de esquistosoma) de una manera dependiente de la dosis. En algunos casos, un control adecuado del procedimiento puede ser un panel de referencia que incluye valores medios predeterminados que se han desarrollado al poner en contacto la célula con diferentes dosis de un compuesto 5-FU. Las muestras biológicas de ejemplo del procedimiento incluyen, pero sin limitarse a ellas, células vivas o tejidos (*in vivo* o *in vitro*), lisados o extractos de células o tejidos, y líquidos corporales (p. ej., sangre, suero, plasma, una fracción procedente de la sangre, heces, efluente colónico u orina).

En otras realizaciones, la presente invención se refiere a los procedimientos para inhibir la actividad de un ARN catalítico (p. ej., una ribozima o mutantes de la misma) en una célula y los procedimientos para inhibir la infección mediante un virus o un microorganismo patógeno en una célula. Tradicionalmente, el descubrimiento de medicamentos se ha centrado en los compuestos que actúan selectivamente sobre los productos proteicos de genes, aunque los ARN como dianas farmacológicas han permanecido mucho tiempo sin explorar. Recientemente, está creciendo el interés en los ARN (Zaman G J R, 2003; Hermann T, 1998; Pearson N D, 1997). Se han hecho esfuerzos por dirigir con moléculas pequeñas los ARN catalíticos en virus y en microorganismos patógenos (Rogers J., 1996, más arriba). En los procedimientos de la presente invención, las células que se han infectado o que corren un riesgo de ser infectadas por un virus o un microorganismo patógeno (p. ej., un parásito) se ponen en contacto con cualquiera de los inhibidores según se describe más arriba (p. ej., tabla 2). Estos inhibidores interfieren con la actividad catalítica del ARN preferiblemente a través de la incorporación en el ARN y se pueden utilizar para dirigir cualquier actividad catalítica de ARN implicada en el funcionamiento (p. ej., replicación del genoma) de los virus o microorganismos patógenos.

En algunos aspectos, los virus de los procedimientos incluyen, pero sin limitarse a ellos, virus de la hepatitis (p. ej., C, B y δ), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del herpes y virus del papiloma humano (VPH). En otros aspectos, los microorganismos patógenos de los procedimientos incluyen, pero sin limitarse a ellos, *Notophthalmus viridescens*, *Ambystoma talpoideum*, *Amphiuma tridactylum* y *Schistosoma mansoni*. Las células de los procedimientos puede ser células de animales (p. ej., células de mamífero tales como las células humanas) o células vegetales (p. ej., tabaco).

Procedimientos de tratamiento y administración

En algunas realizaciones se pueden introducir agentes y efectores en una célula para aplicaciones terapéuticas. Tal y como se utiliza en la presente memoria, una célula incluye, pero sin limitarse a ellas, una célula procariota, tal como una célula bacteriana, y una célula eucariota, tal como una célula de animal, vegetal o de levadura. Una célula que es de origen animal o vegetal puede ser una célula madre o una célula somática. Los animales adecuados pueden ser, por ejemplo, de origen mamífero o aviar. Ejemplos de células de mamífero incluyen células humanas (tales como las células HeLa), bovinas, ovinas, porcinas, murinas (tales como las células madre embrionarias), de conejo y de mono (tales como las células COS1). La célula puede ser una célula embrionaria, una célula madre de la médula ósea u otra célula progenitora. Cuando la célula es una célula somática, la célula puede ser, por ejemplo, una célula epitelial, fibroblasto, célula del músculo liso, célula sanguínea (que incluye una célula hematopoyética, glóbulos rojos, linfocitos T, linfocitos B, etc.), célula tumoral, cardiomiocito, macrófago, célula dendrítica, célula neuronal (p. ej., un gliocito o un astrocito) o célula infectada por patógeno (p. ej., las infectadas por bacterias, virus, virusoides, parásitos o priones).

Las células se pueden obtener comercialmente o de un depósito u obtenerse directamente de un individuo, tal como mediante biopsia. Las células utilizadas se pueden obtener de un individuo al cual regresarán o de otro/diferente individuo de la misma o diferente especie. Por ejemplo, las células no humanas, tales como las células de cerdo, se pueden modificar para que incluyan una construcción de ADN y a continuación introducirlas en un humano. Otra alternativa es que no se necesite aislar la célula del individuo donde, por ejemplo, es deseable administrar el vector al individuo en genoterapia.

Por ejemplo, la presente invención se refiere a un procedimiento para regular la expresión de un gen endógeno (un gen residente en una célula cuando se obtuvo la célula) para producir un producto de ácido nucleico deseado y las composiciones útiles en el procedimiento. El gen endógeno puede ser uno que se expresa (está «encendido») en la célula o uno que normalmente no se expresa (está «apagado») en la célula, pero cuya expresión está o ha sido

encendida o activada. El ADN que codifica una ribozima autoescindible (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como los mutantes de la ribozima de esquistosoma), o un virus o vector vírico que comprende un genoma recombinante que incluye una secuencia nucleotídica (ARN o ADN) que representa el ADN que codifica una ribozima autoescindible se puede introducir en el ADN genómico de las células en una posición tal que, en el ARNm producido por las células, la ribozima autoescindible se encuentra en una posición que da lugar al control de la expresión del producto codificado. En ausencia de un agente que inhibe la expresión de la ribozima autoescindible, se produce la escisión y no se expresa el producto de ácido nucleico deseado. En presencia de tal agente, se inhibe la actividad de escisión y se expresa el producto de ácido nucleico deseado. En una realización, el ADN que codifica una ribozima autoescindible, o un virus o vector vírico que comprende un genoma recombinante que incluye una secuencia nucleotídica (ARN o ADN) que representa el ADN que codifica una ribozima autoescindible se introduce en el ADN genómico entre el promotor operativamente unido al (que controla la expresión del) gen endógeno que codifica el producto de ácido nucleico deseado, de tal manera que el gen endógeno permanece operativamente unido al promotor. En una realización alternativa, el ADN que codifica una ribozima autoescindible, o el virus o el vector vírico, se introduce en el ADN genómico en 3' del gen endógeno que codifica el producto de ácido nucleico deseado. El promotor que está operativamente unido al gen endógeno que hay que expresar puede ser el promotor que tiene el gen de forma natural (endógeno) o puede ser un promotor exógeno introducido en el ADN genómico. Las células resultantes se pueden utilizar, como se describe en la presente memoria, para modular la producción del producto de ácido nucleico deseado en un individuo.

La presente invención también se refiere a las células (células hospedadoras) que comprenden una construcción de ADN de la invención. Las células concretas que comprenden una construcción de ADN de la invención se explican más arriba.

En una realización concreta se pueden utilizar una ribozima (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma) de la invención y una construcción de ADN que codifica la ribozima para producir animales transgénicos que contienen y expresan la ribozima. Hay una amplia gama de técnicas para producir animales transgénicos de la presente invención. Por ejemplo, un ácido nucleico foráneo se puede introducir en la línea reproductiva de un animal mediante, por ejemplo, la introducción del material genético foráneo adicional en un gameto, tal como un óvulo. Otra alternativa es que los animales transgénicos se pueden producir mediante la cría de animales que transfieren el ADN foráneo a su descendencia. También es posible producir animales transgénicos mediante la introducción del ADN foráneo en las células somáticas de las cuales se genera un animal. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «animal transgénico» incluye los animales producidos a partir de células modificadas que contienen ADN foráneo o mediante su reproducción; es decir, incluye la descendencia de animales (ancestros) que se produjeron de tales células modificadas. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «ácido nucleico foráneo» se refiere al material genético obtenido de una fuente que no es el germoplasma parental. Preferiblemente, los animales transgénicos proceden de embriones de mamíferos.

En algunos aspectos, la invención da a conocer un animal no humano recombinante homólogo que expresa la ribozima (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como los mutantes de la ribozima de esquistosoma). La terminología «animal recombinante homólogo» tal y como se utiliza en la presente memoria pretende describir un animal que contiene un gen que se ha modificado mediante recombinación homóloga entre el gen y una molécula de ADN introducida en una célula del animal, p. ej., una célula embrionaria del animal. Se puede crear un animal en el cual el ácido nucleico que codifica la ribozima se ha introducido en un sitio específico del genoma.

Para crear tal animal por recombinación homóloga, se prepara un vector que contiene ADN que codifica la ribozima flanqueada en sus extremos 5' y 3' por otro ácido nucleico de un gen eucariota en el que se tiene que producir la recombinación homóloga. El ácido nucleico adicional flanqueante que codifica la ribozima ha de ser de suficiente longitud para que la recombinación homóloga con el gen eucariota tenga éxito. Típicamente se incluyen varias kilobases de ADN flanqueante (en ambos extremos 5' y 3') en el vector (véase, p. ej., Thomas, K. R. y Capecchi, M. R. (1987) *Cell* 51: 503 para una descripción de vectores de recombinación homóloga). El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (p. ej., por electroporación) y se seleccionan células en las que el ADN introducido se ha recombinado homológamente con el ADN endógeno (véase, p. ej., Li, E. et al. (1992) *Cell* 69: 915).

Además de las estrategias de recombinación homóloga descritas más arriba, se conocen en la técnica los sistemas de integración específicos de sitio asistidos por enzimas, y se pueden aplicar a los componentes del sistema regulador para integrar una molécula de ADN en una localización predeterminada en una segunda molécula de ADN diana. Ejemplos de tales sistemas de integración asistidos por enzimas incluyen el sistema de acción selectiva de la recombinasa Cre-lox (p. ej., como se describe en Baubonis, W. y Sauer, B. (1993) *Nucl. Acids Res.* 21: 2025-2029; y Fukushima, S. y Sauer, B. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7905-7909) y el sistema de acción selectiva de la recombinasa FLP-FRT (p. ej., como se describe en Dang, D. T. y Perrimon, N. (1992) *Dev. Genet.* 13: 367-375; y Fiering, S. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8469-8473).

Se conocen bien en la técnica los procedimientos para adquirir, cultivar, mantener e introducir secuencias de ácido nucleico foráneo en los óvulos de receptor para la producción de animales transgénicos. Véase, por ejemplo, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Hogan et al., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York,

(1986). Preferiblemente, en el embrión se introducirá una construcción de ADN en una etapa muy temprana del desarrollo, de modo que sólo una pequeña fracción de embriones son mosaicos (p. ej., un embrión en el cual la integración del ácido nucleico foráneo se produce después de la etapa de desarrollo de una célula).

Las construcciones de ADN de la presente invención se pueden utilizar en los procedimientos para inducir la expresión de un producto de ácido nucleico deseado en un individuo (p. ej., un humano u otro mamífero o vertebrado). En estos procedimientos, una construcción de ADN de la presente invención se puede introducir en las células obtenidas del individuo. Las células pueden ser migratorias, tal como una célula hematopoyética, o no migratorias, tal como una célula tumoral sólida o un fibroblasto. Después del tratamiento de esta manera, las células resultantes se pueden administrar a (introducirse en) el individuo de acuerdo con los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Para inducir la expresión del producto de ácido nucleico, se puede administrar al individuo un agente (tal como un fármaco) que es capaz de inhibir la escisión de la ribozima autoescindible codificada (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma) de acuerdo con los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Tal procedimiento de tratamiento a veces se denomina tratamiento *ex vivo*. El tratamiento *ex vivo* se ha descrito, por ejemplo, en Kasid et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 473 (1990); Rosenberg et al., *N. Engl. J. Med.*, 323: 570 (1990); Williams et al., *Nature*, 310: 476 (1984); Dick et al., *Cell*, 42: 71 (1985); Keller et al., *Nature*, 318: 149 (1985); y Anderson et al., patente de los Estados Unidos n.º 5.399.346.

En una realización concreta, las construcciones de ADN de la presente invención se pueden utilizar en un procedimiento para expresar en un individuo un producto de ácido nucleico deseado. En este procedimiento se introducen en un individuo las células que comprenden una construcción de ADN de la presente invención. A continuación se administra un agente (tal como un fármaco) que es capaz de inhibir la escisión de la ribozima autoescindible codificada (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma) al individuo, en quien se expresa el ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado, lo que da lugar a la producción del producto. En una realización particular de este procedimiento, la construcción de ADN que comprende: (a) ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado; (b) un promotor operativamente unido al ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado; y (c) ADN que codifica una ribozima autoescindible. El ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado y el ADN que codifica la ribozima autoescindible se encuentran después del promotor. El ADN que codifica la ribozima autoescindible puede estar en 5' o en 3' del ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado. La transcripción de los dos componentes de ADN en la construcción produce un ARNm que comprende la ribozima autoescindible y el ARNm que codifica el producto de ácido nucleico deseado.

Otra alternativa sería que en un procedimiento para expresar un producto de ácido nucleico deseado en un individuo se pueda administrar directamente al individuo una construcción de ADN de la presente invención. El modo de administración es preferiblemente en la localización de las células diana. La administración puede ser nasal o mediante inyección. Se conocen de forma general en la técnica otros modos de administración (parenteral, mucosa, sistémica, implante, intraperitoneal, bucal, intradérmica, transdérmica, intramuscular, intravenosa entre ellas infusión y/o inyección de bolo, subcutánea, tópica, epidural, yugal, rectal, vaginal, etc.). La construcción de ADN puede, preferiblemente, administrarse en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como disolución salina, agua estéril, solución de Ringer o solución isotónica de cloruro de sodio. Un agente (tal como un fármaco) que es capaz de inhibir la escisión de la ribozima autoescindible codificada (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma) se administra a continuación al individuo, en quien se expresa el ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado, lo que da lugar a la producción del producto.

En otra realización, las construcciones de ADN de la presente invención se pueden utilizar en un procedimiento para modular en un individuo la expresión de un producto de ácido nucleico deseado. En este procedimiento se introducen en un individuo las células que comprenden una construcción de ADN de la presente invención. Al individuo se le administra luego un efector que es capaz de fijarse al resto de aptámero del complejo aptámero-ribozima autoescindible, después de lo cual la expresión del ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado se puede inducir, mejorar, reducir, inhibir o regular, según el diseño del complejo que se explicó más arriba. En una realización concreta de este procedimiento, la construcción de ADN que comprende: (a) ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado; (b) un promotor operativamente unido al ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado; y (c) ADN que codifica un complejo aptámero-ribozima autoescindible (p. ej., un motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma que comprende un aptámero insertado en una posición del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma de tal forma que la fijación de un efector al aptámero puede controlar la actividad de escisión del motivo mutante de ARN autoescindible de esquistosoma). Otra alternativa sería que, en un procedimiento para modular la expresión de un producto de ácido nucleico deseado en un individuo, se puede administrar directamente al individuo una construcción de ADN de la presente invención. Los modos de administración incluyen los descritos más arriba. La construcción de ADN puede, preferiblemente, administrarse en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como disolución salina, agua estéril, solución de Ringer o solución isotónica de cloruro de sodio. Un efector que es capaz de fijarse al resto de aptámero del complejo aptámero-ribozima autoescindible se puede administrar luego al individuo, después de lo cual la expresión del ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado se puede inducir, mejorar, reducir, inhibir o regular, según el diseño del complejo que se explicó más arriba.

Los agentes y efectores se pueden administrar a un individuo de muy distintos modos. La vía de administración depende del agente o efector concretos. Las vías de administración se conocen de forma general en la técnica e incluyen las vías bucal, intradérmica, transdérmica (p. ej., polímeros de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa que incluye la infusión y/o inyección de bolo, subcutánea, tópica, epidural, yugal, rectal, vaginal e intranasal. También se pueden utilizar otras vías adecuadas de administración, por ejemplo, para conseguir la absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo.

La dosis de agente, efector y construcción de ADN de la presente invención que se administra a un individuo, que incluye la frecuencia de administración, variará según una serie de factores, entre ellos el modo y vía de administración; estatura, edad, sexo, salud, masa corporal y dieta del receptor; naturaleza y magnitud de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se está tratando; clase de tratamiento concurrente, frecuencia de tratamiento y el efecto deseado.

Composiciones farmacéuticas

En algunas realizaciones, el agente, el efector y la construcción de ADN (conjuntamente denominados agentes terapéuticos en la presente memoria) de la presente descripción se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales agentes terapéuticos se pueden administrar solos o como un componente de una formulación farmacéutica (composición). Las secuencias de ácido nucleico recombinante (p. ej., construcciones de expresión) que codifican una ribozima (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como mutantes de la ribozima de esquistosoma) se pueden utilizar en composiciones terapéuticas (o farmacéuticas) para regular la expresión de un producto de ácido nucleico deseado. Las composiciones terapéuticas de la invención se pueden utilizar solas o en mezcla, o en combinación química, con uno o más materiales, entre ellos otros vectores recombinantes, materiales que incrementan la estabilidad biológica de los vectores recombinantes o materiales que incrementan la capacidad que tienen las composiciones terapéuticas para penetrar específicamente en el tipo de célula pertinente. Las composiciones terapéuticas de la invención se administran en vehículos farmacéuticamente aceptables (p. ej., disolución salina fisiológica), que se seleccionan basándose en el modo y la vía de administración, y la práctica farmacéutica estándar. Los vehículos farmacéuticos adecuados, así como las necesidades farmacéuticas para el uso en las formulaciones farmacéuticas, se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, un texto de referencia estándar en este campo.

Las composiciones terapéuticas de la invención se administran en dosis que un experto en la técnica ha determinado que son apropiadas. Una dosis adecuada es una que ejerce un resultado deseado, p. ej., una reducción en un síntoma de una enfermedad que se desea tratar. Se espera que las dosis varíen en función de las características farmacocinéticas y farmacodinámicas del agente concreto, y su modo y vía de administración, así como la edad, el peso y la salud del receptor; la naturaleza y la intensidad de cualquier enfermedad pertinente; la frecuencia y duración del tratamiento; el tipo de terapia concurrente, si la hay; y el efecto deseado.

Las composiciones terapéuticas de la invención se pueden administrar a un paciente mediante cualquier modo adecuado, p. ej., por vía parenteral, intraperitoneal, bucal, tópica (p. ej., con sulfóxido de dimetilo) o intravenosa, como determine un experto en la técnica. Alternativamente, puede ser necesario administrar las composiciones por métodos quirúrgicos al tejido deseado. Los tratamientos de la invención se pueden repetir cuando sea necesario, según determine un experto en la técnica.

Se puede utilizar cualquier método que lleve a cabo *in vivo* la transferencia de ácidos nucleicos al interior de las células eucariotas. Por ejemplo, las construcciones de expresión de los mismos se pueden empaquetar en liposomas, vectores basados en ácidos nucleicos que no proceden de virus, fantasmas de eritrocitos o microesferas (p. ej., micropartículas; véase, p. ej., las patentes de EE.UU. n.º 4.789.734; y 4.925.673; 3.625.214; y Gregoriadis, *Drug Carriers in Biology and Medicine*, págs. 287-341 (Academic Press, 1979)). Además, la administración de las construcciones de expresión que codifican un motivo mutante de la ribozima se puede llevar a cabo mediante la inyección directa en los tejidos destinatarios, por ejemplo, en un precipitado de fosfato de calcio o conjugado con lípidos.

La ribozima (como la que se produce en la naturaleza o mutantes tales como los mutantes de la ribozima de esquistosoma) proporcionada por vía exógena puede contener nucleótidos modificados, p. ej., nucleótidos modificados que mejoran la estabilidad. Por ejemplo, los motivos mutantes de la ribozima pueden contener enlaces internucleotídicos diferentes a los enlaces de fosfodiéster, tales como enlaces fosforotioato, metilfosfonato, metilfosfodiéster, fosforoditiotato, fosforamidato, fosfotriéster o de éster de fosfato (Uhlman et al., *Chem. Rev.* 90(4): 544-584, 1990; Tidd et al., *Anticancer Research* 10: 1169, 1990). La estabilidad de las ribozimas también se puede incrementar incorporando 3'-desoxitimidina o nucleótidos 2'-sustituídos (sustituídos con, p. ej., grupos alquilo) en las ribozimas durante la síntesis, lo que genera las ribozimas como derivados de fenilisourea, o que les hace tener otras moléculas, tales como aminoacridina o polilisina, unidas a los extremos 3' de los snoRNA (véase, p. ej., Tidd et al., *Anticancer Research* 10: 1169-11 S2, 1990). Las modificaciones de los nucleótidos de ARN de los motivos de la ribozima de la invención pueden estar presentes por todas las ribozimas o en regiones concretas. Los vectores de ADN que codifican los motivos de la ribozima se pueden modificar para incrementar su capacidad para penetrar el tejido deseado mediante, p. ej., al conjugarlos a compuestos lipófilos. Además, los vectores de ADN se pueden dirigir a células concretas al conjugarlos a ligandos específicos para los receptores de la superficie celular de una

célula diana. Los vectores de ADN también se pueden dirigir a tipos de células específicas conjugándolos a anticuerpos monoclonales que se fijan específicamente a los receptores específicos del tipo celular.

Para la administración tópica, se aplica al sitio deseado sobre la piel una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios agentes terapéuticos, preferiblemente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, p. ej., una crema, gel, loción o ungüento que se pueda extender, o un líquido tal como una disolución salina. Para el uso en la piel, la penetración de los ácidos nucleicos en el tejido se puede llevar a cabo mediante una serie de procedimientos conocidos por los expertos en este campo. Por ejemplo, las construcciones de expresión se pueden incorporar en un parche transdérmico que se aplica sobre la piel. Preferiblemente, la penetración que resulta de estos procedimientos se potencia con un agente químico de administración transdérmica tal como sulfóxido de dimetilo (DMSO) o el tensioactivo no iónico sulfóxido de n-decilmétilo (NDMS), como se describió en Choi et al., *Pharmaceutical Res.*, 7 (11): 1099, 1990. Las dosis para una cantidad terapéuticamente eficaz para la aplicación tópica estarían en el margen de 100 ng a 10 mg por área de la superficie tratada al día.

Ejemplos

La invención que ahora se describe de forma general se entenderá con más facilidad por referencia a los ejemplos siguientes, que se incluyen simplemente con el propósito de ilustrar determinadas realizaciones y realizaciones de la presente invención, y no se pretende que limiten la invención.

Los estudios recientes del control de las vías metabólicas específicas en las bacterias han dejado constancia de la existencia de mecanismos para controlar la expresión génica completamente «basados en ARN», lo que implica la modulación de la traducción, terminación de la transcripción o autoescisión del ARN a través de la interacción directa de metabolitos intracelulares específicos y secuencias de ARN (Winkler et al., 2002, *Nature* 419, 952-6; Winkler et al., 2004, *Nature* 428, 281-6; Mandal et al., 2004, *Nat. Struct. Mol.* 11, 29-35; Cech et al., 2004, *Nature*, 428, 263-4). Aquí, los solicitantes demuestran que un sistema de regulación génica análogo «basado en ARN» se puede diseñar con eficacia mediante la incorporación de secuencias que codifican los motivos de ARN autoescindibles (Cech et al., 1990, *Biosci Rep* 10, 239-61) en la unidad transcripcional de un gen o vector. Cuando se colocan adecuadamente, las secuencias conducen a una inhibición potente de la expresión del gen o del vector debido a la escisión espontánea del transcrito de ARN. La administración de oligonucleótidos complementarios a las regiones del motivo autoescindible, o bien una molécula pequeña específica, da lugar a la inducción eficaz de la expresión génica, debido a la inhibición de la autoescisión del ARNm. La regulación eficaz de la expresión del transgén se muestra que es posible en una serie de líneas celulares de mamíferos y en los animales vivos. Junto a otras tecnologías emergentes (Silverman et al., 2003, *RNA* 9, 377-83), la metodología general puede ser particularmente aplicable al desarrollo de los sistemas de regulación génica adaptados a cualquier molécula inductora pequeña y aseguran nuevos medios de detección biológica *in vivo* que pueden tener una aplicación importante en la administración regulada de los productos terapéuticos proteicos.

En la figura 1a se muestra la estrategia general para controlar la expresión génica mediante la modulación del procesamiento del ARN. La estrategia depende de forma crítica de la capacidad que una ribozima autoescindible específica tiene para efectuar la escisión muy eficaz (>99%) de una molécula de ARNm en el que se está insertada, y la disponibilidad de una molécula pequeña capaz de inhibir con eficacia la autoescisión de la ribozima que actúa *in cis* dentro de un medio intracelular. Una primera etapa de nuestros estudios fue identificar las secuencias de ribozima candidatas capaces de llevar a cabo una escisión eficaz en el contexto de un vector de «expresión». Para este propósito, los solicitantes utilizaron un ensayo de transfección transitoria que implica un vector de expresión de mamífero estándar (Ory et al., 1996, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11400-6) que codifica un indicador LacZ (figura 1b). Se introdujeron secuencias de ribozima candidatas en numerosas localizaciones diferentes dentro de la unidad transcripcional del vector y, en paralelo, las ribozimas mutantes inactivas correspondientes se introdujeron en los mismos sitios para proporcionar un modo de medir la eficacia de la reducción de la expresión del gen indicador. Después de la transfección de las células 293 con estos vectores, se prepararon extractos de proteínas celulares y se cuantificó el nivel de la β -gal. La actividad de escisión de la ribozima funcional en las células se midió como las «veces» de supresión de la expresión del gen indicador respecto al vector con su ribozima inactiva.

Se eligieron para el análisis un gran número de motivos diferentes codificados en ribozimas, entre ellas las secuencias de ribozimas naturales sin manipular, ribozimas que se demostró que funcionaban en las células de mamíferos y ribozimas manipuladas genéticamente por otros para que posean unas propiedades bioquímicas o catalíticas específicas *in vitro* (p. ej., Kcat alta, poca necesidad de Mg^{++} , etc.). Véase la tabla 1 que viene a continuación. Mientras que la inmensa mayoría de las ribozimas analizadas no afectaron de manera apreciable a la expresión del indicador, según se reflejaba en que LacZ se expresaba casi lo mismo en los vectores que codifican ribozimas funcionales e inactivas (definidas como «veces» = 1), se identificaron dos motivos de ribozima que parecieron funcionar con eficacia: la ribozima en cabeza de martillo Pst-3 procente del grillo cavernícola *Dolichopoda* (Rojas et al., 2000, *Nucleic Acids Res* 28, 4037-43) (figura 1c; 13 veces de diferencia entre la ribozima inactiva y la funcional) y la ribozima en cabeza de martillo Sm1 procedente del tremátodo *Schistosoma mansoni* (Ferbeyre et al., 1998, *Mol Cell Biol* 18, 3880-8) (figura 1d) en la que el tetralazo 5'UUCG3' estaba insertado en un tallo III extendido (19 veces de diferencia). Resulta interesante que las dos ribozimas posean estructuras únicas respecto a otras ribozimas en cabeza de martillo, por contener un «tallo I» extendido con un lazo interno (véanse las figuras 1c y 1d).

Tabla 1. Estudio básico de la capacidad que diferentes ribozimas tienen para funcionar en las células de mamífero.

Ribozima	Veces	Comandos
cabeza de martillo de Zillmen ¹	1	tallo II corto, trabaja con poco Mg ⁺⁺
cabeza de martillo de Lockett ²	1	tallo II corto, trabaja con poco Mg ⁺⁺
cabeza de martillo de Szostak ³	1	tallo II corto, velocidad catalítica más alta
cabeza de martillo de Taira ⁴	1	funciona en las células
La de Taira insertada en tRNA ⁴	1	el tRNA ayuda a estabilizar la ribozima
cabeza de martillo de McSwiggen ⁵	1	funciona en las células
cabeza de martillo de Uhlenbeck ⁶	1	tallo I corto, velocidad catalítica más alta
cabeza de martillo de ABSV ⁷	1	ribozima como la que se produce en la naturaleza
horquilla de TRSV ⁶	1	ribozima como la que se produce en la naturaleza
cabeza de martillo de TRSV ⁸	1	ribozima como la que se produce en la naturaleza
ribozima de <i>Neurospora</i> ⁹	1	ribozima como la que se produce en la naturaleza
ribozima del virus de la hepatitis δ ¹⁰	1	ribozima como la que se produce en la naturaleza
cabeza de martillo de tritón ¹¹	1	ribozima como la que se produce en la naturaleza
cabeza de martillo de grillo ¹²	13	ribozima como la que se produce en la naturaleza
cabeza de martillo de esquistosoma ¹³	1	ribozima como la que se produce en la naturaleza
de esquistosoma con un nuevo lazo III	19	ribozima como la que se produce en la naturaleza

Las ribozimas anteriores se pueden encontrar en las siguientes referencias: 1) Zillmann et al., *RNA* 3, 734-47 (1997); 2) Conaty et al., *Nucleic Acids Res* 27, 2400-7 (1999); 3) Salehi-Ashtiani et al., *Nature* 414, 82-4 (2001); 4) Yuyama et al., *Nucleic Acids Res* 22, 5060-7 (1994); 5) Chowrira et al., *J Biol Chem* 269, 25856-64 (1994); 6) Clouet-d'Orval et al., *Biochemistry* 36, 9087-92 (1997); 7) Hutchins et al., *Nucleic Acids Res* 14, 3627-40 (1986); 8) Buzayan et al., *Virology* 151, 186-199 (1986); 9) Rastogi et al., *Embo J* 15, 2820-5 (1996); 10) Been et al., *Eur J Biochem* 247, 741-53 (1997); 11) Zhang et al., *Gene* 172, 183-90 (1996); 12) Rojas et al., *Nucleic Acids Res* 28, 4037-43 (2000); 13) Ferbeyre et al., *Mol Cell Biol* 18, 3880-8 (1998).

Basándose en su mayor nivel de actividad de autoescisión, la ribozima Sm1 se eligió para los demás estudios y la manipulación. En un intento por mejorar la eficacia de la actividad de autoescisión de la ribozima Sm1, se hicieron y evaluaron una serie de modificaciones de la estructura de la ribozima Sm1. Tal y como se muestra en la figura 1d, la modificación específica del nucleótido 7 (C en U) en el núcleo catalítico conservado (Hertel et al., 1992, *Nucleic Acids Res* 20, 3252) y los cambios en el tallo III distal condujeron a un incremento significativo de la magnitud de la autoescisión (la ribozima Sm1 modificada se denominó «N73», con una diferencia de hasta 62 veces entre la ribozima funcional y la inactiva). La transferencia de la ribozima N73 desde la posición A a la E del vector mejoró la actividad a 225 veces (esta ribozima se denominó 'N79' y se utilizó en los estudios posteriores). Otras modificaciones del tallo I cerca del núcleo catalítico y cerca del sitio de inserción de la restricción incrementaron aún más la actividad, lo que finalmente dio lugar a una diferencia global de 1401 veces de los niveles de expresión entre la ribozima inactiva y la funcional (figura 1e).

Además de las modificaciones que condujeron a la mejora de la actividad de autoescisión, varias modificaciones redujeron considerablemente el nivel de la autoescisión, especialmente las que implican el acortamiento del tallo I (figura 1f) y la alteración de los nucleótidos del lazo interno del tallo I (figura 1g). Resulta interesante que ninguna de esas modificaciones afecten a secuencias del núcleo conservadas que se sabe que son necesarias para la escisión de la ribozima *in vitro* (Ruffner et al., 1990, *Biochemistry* 29, 10695-702). En las condiciones *in vitro* estándares de Mg⁺⁺ a 10 mM, la medición de la actividad catalítica de la ribozima N79 y de la N107 (U por G), que lleva un cambio de una sola base de U por G en el lazo I y es inactiva en las células de mamífero (figura 1g), indicó que las dos ribozimas eran igualmente funcionales *in vitro* (valores de Kobs de 0,84 min y 1,06 min, respectivamente, véase Métodos complementarios). Sin embargo, resultó intrigante que la determinación de la velocidad de escisión a 0,5 mM de Mg⁺⁺ indicara que sólo la enzima N79 poseía una actividad significativa en las condiciones de poco Mg⁺⁺ (ribozima N79 con Kobs = 0,84 min frente a la ribozima N107 (U por G) con Kobs = 0,014 min). Estos resultados sugieren que las secuencias dentro de la estructura única de lazo del tallo I de la ribozima Sm1 pueden permitir la autoescisión eficaz en las células de mamífero en parte porque facilitan la autoescisión a concentraciones fisiológicas de Mg⁺⁺. De modo coherente con esta idea, la medición de Kobs de otra ribozima en cabeza de martillo bien caracterizada (cabeza de martillo de McSwiggen, tabla 1) que otros demostraron que funcionaba en las células de mamífero, mostró sin embargo en nuestro ensayo de transfección que no poseía ninguna actividad apreciable, lo que indicó que la actividad significativa de escisión *in vitro* se produjo sólo en las condiciones de Mg⁺⁺ alto (0,32 min

en Mg^{++} a 10 mM frente a 0,015 min en Mg^{++} a 0,5 mM). Sin embargo, sigue sin estar claro hasta qué punto la capacidad para funcionar a una concentración baja de Mg^{++} por sí misma contribuye a la capacidad de una ribozima para funcionar con eficacia en las células de mamífero, ya que varias ribozimas manipuladas genéticamente por otros para que funcionen con eficacia *in vitro* en las condiciones de Mg^{++} bajas¹³⁻¹⁴ estaban entre las muchas ribozimas que se halló que no eran funcionales en nuestro ensayo de transfección transitoria.

Los solicitantes también encontraron que la eficacia de las ribozimas de esquistosoma era independiente de la cantidad del ADN plasmídico transfectado en las células de mamífero. En el ensayo de transfección se analizó un amplio abanico de concentraciones de ADN plasmídico. Se halló que la eficacia de las ribozimas de esquistosoma permanecía inalterada con cantidades crecientes de ADN transfectado. Esto sugiere que la actividad de las ribozimas de esquistosoma es en buena parte independiente del origen de la célula y se puede acoplar a un promotor fuerte para producir un gran número de copias del ARNm a regular. Los solicitantes analizaron cuatro clases de promotores (promotor del CMV, promotor del EF1- α , promotor de la ubicuitina C y promotor lentivírico) y hallaron que todos funcionaban bien con las ribozimas de esquistosoma. Ya que el mecanismo de las ribozimas debe ser independiente de los sistemas promotores, los solicitantes creen que las ribozimas de esquistosoma deben ser capaces de funcionar con todos los promotores diferentes. Los solicitantes también analizaron cuatro clases de genes indicadores (Lac-Z, GFP, dsRED y luciferasa) y todos ellos funcionaban bien con las ribozimas de esquistosoma. Los solicitantes creen que las ribozimas de esquistosoma deben funcionar con otros genes indicadores. Los solicitantes encontraron además que las ribozimas de esquistosoma funcionaban no sólo en las células transfectadas transitoriamente, sino también en las células transfectadas de forma estable. Se generaron varias líneas estables de células HEK-293 que contenían ribozimas de esquistosoma. Estas líneas celulares se utilizaron después para escrutar las colecciones de compuestos pequeños que finalmente condujeron al descubrimiento de fármacos que inhibían la ribozima y, así pues, la regulación de la expresión génica (véase más abajo).

Por ejemplo, además de funcionar en las células 293 dentro del contexto del vector pMD basado en el CMV original, la ribozima N79 también redujo considerablemente después de la transfección la expresión de la β -gal en una serie de líneas celulares diferentes de uso corriente (figura 2a). Además, la ribozima N79 fue capaz de funcionar con eficacia cuando se colocó dentro de otras unidades transcripcionales que utilizaron diferentes promotores y un gen indicador diferente (eGFP) (figura 2b). Tal y como los solicitantes habían observado en el escrutinio primario de diferentes motivos de ribozima en busca de la actividad en las células de mamífero, la N79 era capaz de funcionar cuando se colocaba en varias posiciones, pero no en todas, de la unidad transcripcional de pMD, aunque con eficiencias diferentes (figura 2c). Es importante el hecho de que la colocación de las dos secuencias de ribozima en tandem, en algunos casos (p. ej., posición E) condujo a una supresión considerable de la expresión del gen indicador (figura 2c).

Un requisito esencial para el desarrollo de un sistema de regulación génica basado en la modulación de la actividad de autoescisión es la biodisponibilidad de moléculas inductoras pequeñas capaces de inhibir con eficacia la actividad de la ribozima en células de mamíferos. En un intento de identificar tales moléculas, los solicitantes primero estudiaron un gran número de antibióticos corrientes que se había demostrado que inhibían la escisión de la ribozima *in vitro* (tabla 1 anterior) (Hermann et al., 1998, *J Mol Biol* 276, 903-12; Jenne et al., 2001, *Nat Biotechnol* 19, 56-61; Murray et al., 1996, *Biochem J* 317 (Pt 3), 855-60; Stage et al., 1995, *RNA* 1, 95-101; Tor et al., 1998, *Chem Biol* 5, R277-83; von Ahsen et al., 1991, *Nature* 353, 368-70). En ningún caso se observó una inhibición significativa de la autoescisión por estos antibióticos en nuestro ensayo de transfección transitoria.

Los solicitantes estudiaron luego la capacidad de diferentes tipos de oligonucleótidos antisentido (Braasch et al., 2002, *Biochemistry* 41, 4503-10) para inhibir la escisión de la ribozima (véase la figura 1e para la secuencia diana, SEQ ID n.º 67). Mientras que la transfección con los PNA, LNA y NA "grip" no tuvo ningún efecto medible sobre la actividad de autoescisión, y los ARN modificados con fosforotioato, 2'-O-metilo y fosforotioato y 2'-O-metilo condujeron a una modesta inhibición de la autoescisión (inducción de 10 veces), la transfección de un morfolino oligonucleótido (Morcos et al., 2001, *Genesis* 30, 94-102) condujo a una fuerte inhibición de la autoescisión de la ribozima, como se reveló por un incremento considerable de la expresión del gen indicador (figura 3a). Aunque las veces de inducción proporcionadas por este procedimiento eran un tanto variables entre los experimentos (de 110 a 2000 veces en el caso de una construcción de N79 doble), muy probablemente debido a la variabilidad de la eficacia de la introducción del oligonucleótido y a la toxicidad asociada a la transfección del oligonucleótido, la magnitud de la inducción de la expresión génica era sin embargo comparable a la de otros sistemas de regulación génica y claramente representa un margen que sería útil en una serie de situaciones experimentales y clínicas. En algunos casos, el nivel absoluto de la expresión del gen conseguido después de la administración de morfolino alcanzó un 50% de la inducción máxima teórica que era posible (a saber, el nivel de la expresión génica producida por la ribozima inactiva), lo que sugiere que la escisión de la ribozima se pudo inhibir de manera muy eficaz en las células de mamífero.

Los solicitantes generaron líneas celulares estables que llevaban una construcción de expresión integrada en la que un luciferasa indicadora se colocó bajo el control de dos copias de la ribozima N79 e hicieron uso de las células en estudios de escrutinio de alto rendimiento para identificar compuestos de moléculas pequeñas capaces de inhibir la autoescisión de la ribozima. De los compuestos identificados (tabla 2, a continuación), se halló que la toyocamicina (Aszalos et al., 1966, *J Antibiot* (Tokyo) 19, 285), un análogo nucleosídico, era uno de los inhibidores más potentes

de la actividad de la ribozima. Tal y como se muestra en la figura 3b, la administración de toyocamicina a 1,5 μ M a las mismas células condujo a un incremento drástico de la expresión de la proteína de la luciferasa. Un análisis paralelo de la expresión del ARNm de la luciferasa demostró que, en ausencia del fármaco, se produjo poco, o nada, del ARNm de la luciferasa en el núcleo o en el citoplasma, mientras que en las células tratadas con el fármaco, la cantidad del ARNm de la luciferasa se incrementó a un nivel comparable al de las células que llevan la ribozima inactiva (figura 3c). La ausencia de ARNm detectable en las células sin tratar sugiere que los ARNm escindidos se degradan rápidamente, supuestamente porque los fragmentos escindidos carecen de las secuencias convencionales de los extremos de los ARNm.

Tabla 2. Compuestos que se halló que inhibían la actividad de la ribozima en las células

Nombre del compuesto	CE50 (μ M)	Veces _{máx}	Clase
Toyocamicina	0,4	365	ribonucleósido
8-Azaadenosina	4	45	ribonucleósido
Sangivamicina	1	38	ribonucleósido
Tubercidina	2,5	58	ribonucleósido
Monofosfato cíclico de tubercidina	34	35	ribonucleósido
Monofosfato de tubercidina	2	39	ribonucleósido
Trifosfato de tubercidina	2	35	ribonucleósido
Nebularina	10	8	ribonucleósido
Nucleósido tricíclico	40	12	ribonucleósido
5-FluoroUridina	5,9	120	ribonucleósido
5-BromoUridina	267	16	ribonucleósido
5-FluoroUracilo	200	377	pirimidina
Syto-83	7	26	colorante de fijación al ARN
Bromuro de etidio	2	8	colorante de fijación al ARN
Naranja de acridina	7	4	colorante de fijación al ARN

Además de la toyocamicina, los compuestos de 5'-FU (tales como 5'-FluoroUridina y 5'-FluoroUracilo) son otros dos potentes inhibidores de la actividad de la ribozima (tabla 2). Estos dos compuestos de 5'-FU son análogos de nucleósidos. Las figuras 9A-9B muestran que la 5'-Furidina (A) y el 5'-Furacilo (B) indujeron la expresión génica mediante la inhibición de la autoescisión de la ribozima de una manera dependiente de la dosis. Tal y como se muestra en las figuras 9A y 9B, la administración de los dos compuestos de 5'-FU en las células condujo a un incremento considerable de la expresión de la proteína de la luciferasa de una manera dependiente de la dosis.

A diferencia de la toyocamicina, la adenosina, un compuesto relacionado, no poseía ninguna capacidad para inhibir la autoescisión de la ribozima. Mientras que los ensayos anteriores indican que la autoescisión es muy eficiente en la línea de células estable, la medición sensible de la actividad de la luciferasa mediante emisión de fotones indica que hay, no obstante, una cantidad extremadamente baja, pero detectable, de expresión de la luciferasa por encima del nivel de emisión de fondo de las células de control que no llevan el gen de la luciferasa (véase la leyenda de la figura 3).

Tras haber documentado la capacidad que el sistema de regulación basado en la ribozima tiene para funcionar en un cultivo de células de mamífero, una cuestión final e importante a tratar era si la maquinaria intracelular y el 'entorno' necesario para la autoescisión eran operativos en las células primarias *in vivo*. Para abordar esta cuestión, los solicitantes generaron genomas recombinantes del virus adenoasociado (AAV) que llevan unidades de transcripción procedentes de vectores pMD ribozima-luciferasa que poseen dos copias de la ribozima N79 funcional o inactiva en la posición E y prepararon muy concentrado el virus que reconoce el margen de hospedadores del serotipo 5 del AAV. A continuación, los dos virus se inyectaron a ratones atímicos por vía subretiniana como se describe en 'Métodos'. Para proporcionar un medio de normalización para las diferencias de la capacidad de medir la actividad de la luciferasa en diferentes días (tales como variaciones debido a la administración del sustrato luciferina), todos los animales también recibieron inyecciones en los músculos isquiotibiales de la pata trasera con virus AAV que llevan las ribozimas N79 inactivas. Al cabo de 21 días se tomaron imágenes de los animales inyectados para detectar la expresión del gen de la luciferasa utilizando el Xenogen IVIS Imager, que proporciona una medición cuantitativa de la expresión de la luciferasa basándose en una detección de fotones simples (Contag

et al., 1998, *Nat Med* 4, 245-7). Inmediatamente después de la toma de imágenes, las cohortes de ratones inyectados con el virus que lleva la secuencia de la ribozima funcional se implantaron bajo la piel dorsal con microgránulos de liberación retardada durante 7 días que contenían toyocamicina o bien adenosina (Innovative Research of America, Inc.), mientras a otra cohorte de ratones que recibió inyecciones con el virus que llevaba la secuencia de la ribozima inactiva se le implantaron microgránulos de toyocamicina. Dos días después, se tomaron imágenes de los animales para detectar la expresión de la luciferasa. Las imágenes representativas de los ratones de cada grupo de tratamiento, tomadas antes y después del tratamiento farmacológico, se muestran en la figura 4. Las imágenes demuestran que, como se espera, los ratones a los que se inyectó el virus que lleva las ribozimas inactivas mostraron una expresión robusta de la luciferasa en la retina, y la expresión era independiente de la administración de la toyocamicina (figura 4, panel superior). Los ratones que a los que se inyectó el virus que lleva dos ribozimas funcionales y se les implantaron microgránulos de adenosina mostraron poca, o ninguna, expresión del gen antes o después del tratamiento con adenosina (figura 4, panel central), en concordancia con que la adenosina es incapaz de inhibir la autoescisión de la ribozima. Es importante señalar que los ratones a los que se inyectó el virus que lleva las ribozimas funcionales mostraban una expresión fácilmente detectable sólo después del tratamiento con toyocamicina (figura 4, panel inferior). La cuantificación de la emisión de fotones indicó que la expresión génica se inducía 39, 185 y 191 veces en los tres ratones infectados con el virus que lleva las ribozimas funcionales y tratados con toyocamicina. En el último caso (el animal que muestra una inducción de 191 veces), la expresión génica inducida alcanzó un nivel en el intervalo del 40% de la expresión del gen del virus que lleva las ribozimas inactivas. Estos resultados indican que la regulación génica mediada por la ribozima se puede llevar a cabo en una situación *in vivo*. Mientras que la retina era particularmente accesible al 'inductor' debido a su intensa vascularización, los solicitantes han demostrado en experimentos preliminares que la regulación génica se puede llevar a cabo en muchos otros sitios anatómicos *in vivo* (p. ej., músculo y oído).

En conjunto, los estudios descritos aquí proporcionan una importante «demostración preliminar» para las estrategias de regulación génica basadas en la modulación del procesamiento del ARN. Específicamente, el hecho de que la «autoescisión» eficaz de la ribozima se pueda hacer que se produzca *in vivo* en una serie de líneas celulares diferentes de mamíferos, y en las células primarias, sugiere que las células de mamífero en general son «permisivas» para la autoescisión eficaz de la ribozima y, por lo tanto, que los sistemas de regulación basados en ribozimas puede ser aplicables de forma general a la manipulación de la expresión génica en las células y en los animales. Además de las implicaciones para el desarrollo de estrategias de regulación génica, los estudios también proporcionan un fundamento teórico convincente para determinar si existen en las células de mamífero los mecanismos sólo con ARN «como los que se producen en la naturaleza» para la regulación génica.

Los sistemas utilizados con más frecuencia para controlar la expresión génica, que se basan en la regulación de la transcripción (Gossen et al., 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5547-51; Rivera et al., 1996, *Nat Med* 2, 1028-32; Suhr et al., 1998, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 7999-8004; Wang et al., 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 8180-4) han resultado ser herramientas experimentales muy poderosas. Sin embargo, a pesar de su utilidad, tales sistemas poseen al menos ciertas limitaciones prácticas y teóricas debido a su dependencia de transactivadores transcripcionales quiméricos y de elementos promotores especializados. Estas limitaciones incluyen la necesidad de reintroducir construcciones de expresión para que el transactivador así como para el transgén a regular, la posible toxicidad debida a la expresión de un transactivador quimérico, las dificultades a la hora de aplicar tales sistemas en la regulación de los genes celulares endógenos debido a que se necesita un promotor especializado y al escaso número de moléculas pequeñas inductoras que están disponibles para aplicaciones experimentales y terapéuticas. A diferencia de los sistemas basados en la regulación de la transcripción, los solicitantes del sistema basado en ribozimas han descrito que no requiere la expresión de ningún producto transactivador proteico y que no depende del uso de ningún elemento promotor especializado y, por lo tanto, en teoría, representa un sistema de regulación «portátil» que se podría «insertar» en cualquier gen endógeno o unidad de transcripción manipulados genéticamente en un vector. Aunque los dos inhibidores de la autoescisión de la ribozima que los solicitantes han descrito que no es ideal para muchas aplicaciones experimentales, es probable que se puedan identificar otros inductores con más propiedades farmacocinéticas deseables y perfiles de toxicidad a través de un escrutinio de alto rendimiento, evaluación adicional de oligonucleótidos antisentido específicos, y los procedimientos para su administración *in vivo* en las células o a través de la aplicación de varias tecnologías emergentes. En este último aspecto, los estudios recientes han demostrado que es posible generar ribozimas cuya actividad de autoescisión *in vitro* está controlada por un ligando específico, bien mediante un enlace «acertado» de las secuencias de aptámero del ARN a regiones específicas de la ribozima en cabeza de martillo (Breaker et al., 2002, *Curr Opin Biotechnol* 13, 31-9), o a través del uso de las tecnologías de evolución *in vitro* (Wilson et al., 1999, *Annu Rev Biochem* 68, 611-47). La aplicación de estas tecnologías a la estrategia para controlar la expresión génica descrita aquí debe hacer que en el futuro sea posible «diseñar a medida» sistemas de regulación específicos basados en ribozimas para cualquier ligando de molécula pequeña. Tal estrategia debe proporcionar una metodología general para el desarrollo de sistemas de regulación génica que se basan en ligandos con unas propiedades farmacocinéticas deseables y/o específicas. Además, las tecnologías combinadas deben proporcionar los medios para controlar de manera independiente y simultánea la expresión de múltiples productos génicos, y expresar los productos génicos en respuesta a la concentración de alguna molécula intracelular o combinaciones de moléculas. Tal forma de «sensor biológico» debería tener unas amplias aplicaciones experimentales y terapéuticas.

Procedimientos:

1) Protocolo de transfección:

Se diluyeron 1,5 µl de Eugene-6 (Roche, Basilea, Suiza) en 100 µl de OPTIMEM (Gibco, Carlsbad, California) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Esta solución se añadió gota a gota a 0,45 µg del ADN plasmídico y se incubó durante 15 minutos. El ADN plasmídico contiene bien una ribozima mutante o de tipo silvestre y un gen LacZ indicador. A continuación, la mezcla de ADN se añadió gota a gota a 3×10^5 células HEK 293 (se sembraron en placas de 35 mm el día anterior). Las células se recogieron para el ensayo de la β-galactosidasa 24 horas después de la transfección.

2) Ensayo de expresión transitoria del indicador:

Los plásmidos que llevan diferentes ribozimas se transfectaron en células HEK 293T y se lisaron 24 horas después. Los extractos celulares se incubaron con ONPG y la cantidad de β-galactosidasa de los extractos celulares se midió por cuantificación del ONPG procesado en un luminómetro.

3) Ensayos para la actividad de la ribozima:

Se determinó la actividad de escisión por comparación del nivel de β-galactosidasa medido en la muestra problema con un control que comprende una mutación puntual (A → G) en la posición 14 que atenúa la actividad de la ribozima. Brevemente, las células HEK293 transfectadas se lisaron con una solución de lisis y los extractos de células se separaron de los despojos de las células. A continuación, los extractos se incubaron con ONPG, un sustrato cromógeno de la β-galactosidasa. La escisión del ONPG por acción de la β-galactosidasa dio lugar a un color amarillo. La intensidad de la emisión de luz amarilla se midió con un luminómetro (Miller J., *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York (1972)).

La mayoría de los ensayos de los solicitantes sobre la actividad de la ribozima se realizaron con la proteína. Las ribozimas activas (de tipo silvestre) produjeron pocas o ninguna proteína, mientras que las ribozimas inactivas (el mutante) permitió que se produjera mucha proteína. Los solicitantes también realizaron análisis de tipo Northern para comparar la cantidad de ARNm. Se encontró que la línea celular que contenía las ribozimas activas no tenía una cantidad detectable de ARNm ni en el núcleo ni el citoplasma, en comparación con la gran cantidad de ARNm hallado en las células con las ribozimas inactivas. Esto concuerda con la idea de que las ribozimas actuaban a nivel transcripcional.

4) Medición de la velocidad catalítica:

Se generaron ribozimas mediante transcripción *in vitro* en presencia de 50 µM de oligonucleótidos antisentido bloqueantes. Las ribozimas completas se purificaron y la velocidad de escisión se determinó en 50 mM de Tris-HCl, pH 7,5 a 23 °C. Se calculó la Kobs de acuerdo con la ecuación $F_t = F_0 + F_\infty(1 - e^{-k_t t})$.

5) Toma de imágenes bioluminiscentes no invasiva:

Antes de tomar las imágenes, a los ratones anestesiados se les inyectaron 150 µl de luciferina (30 mg/ml) y las pupilas se humedecieron y dilataron con tropicamida al 1%. Se tomaron una serie de imágenes bioluminiscentes incluso de 30 minutos con el Xenogen IVIS Imager. Se cuantificó la emisión de fotones en la meseta del transcurso de tiempo mediante el programa informático LivingImage. Se calcularon las veces de inducción en función de los fotones emitidos en la retina antes y después del tratamiento con el fármaco, y se normalizó por la emisión de fotones desde los músculos de la pata. Se compró la adenosina a Innovative Research of America.

Aunque se han explicado las realizaciones específicas de la invención objeto, la especificación anterior es ilustrativa y no restrictiva. A los expertos en la técnica les serán evidentes muchas variaciones de la invención tras analizar esta especificación y las reivindicaciones que vienen a continuación.

REIVINDICACIONES

1. Ribozima autoescindible que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

cugagaugcagguacauccagcugaguccaaauaggacgaaacgccuucggguguccuggauuc
cacugcuauccac (SEQ ID NO: 3);

cugagaugcagguacauccagcugaguccaaauaggacgaaacgccuucggguguccuggauuc
cacugcuauccac (SEQ ID NO: 4);

5 cugagaugcagguacauccagcugaguccaaauaggacgaaacgccuucggugcuguccuggau
uccacugcuauccac (SEQ ID NO: 5);

cugagaugcagguacauccacugaguccaaauaggacgaaacgccuucggugcuguccuggau
uccacugcuauccac (SEQ ID NO: 7);

cugagaugcagguacauccacugaguccaaauaggacgaaacgccuucggugcuguccuggau
uccacugcuauccac (SEQ ID NO: 8);

agguacauccagcugaguccaaauaggacgaaacgccuucggugcuguccuggauuccacu (SEQ ID n.º: 10);

ccagcugagaguccaaauaggacgaaacgccuucggugcuguccugg (SEQ ID n.º: 11);

10 cugaggugcagguacauccagcugaguccaaauaggacgaaacgccuucggugcuguccuggau
uccacugcuauccac (SEQ ID NO: 12);

cugagaugcagguacauccagcugaguccaaauaggacgaaacgccuucggguguccuggauuc
cacugcuauccac (SEQ ID NO: 14);

cugagaugcagguacauccagcugaguccaaauaggacgaaacgccuucggguguccuggauuc
cacugcuauccac (SEQ ID NO: 15);

cugagaugcagguacauccacugaguccaaauaggacgaaacgccuucggugcuguccuggau
uccacugcuauccac (SEQ ID NO: 18);

cugagaugcagguacauccacugaguccaaauaggacgaaacgccuucggugcuguccuggau
uccacugcuauccac (SEQ ID NO: 19);

15 cugagaugcagguacauccagcugaguccaaauaggacgaaacgccuucggguguccuggauuc
cacugcuauccac (SEQ ID NO: 20);

cugagaugcagguacauccagcugaguccaaauaggacgaaacgccuucggguguccuggauuc
cacugcuauccac (SEQ ID NO: 21);

cugagaugcagguacauccagcugaguccaaauaggacgaaacgccuucggguguccuggauuc
cacugcuauccac (SEQ ID NO: 22);

cugagaugcagguacauccagcugaguccaaauaggacgaaacgccuucggguguccuggauuc
cacugcuauccac (SEQ ID NO: 23);

cugagaugcagguacauccagcugaguccaaauaggacgaaacgccuucgggucuccuggauuc
acugcuauccac (SEQ ID NO: 24);

cugagaugcagguacauccagcugaugaguccaaaauaggacgaaacgccuucgggccucguggaauuc
cacugcuauccac (SEQ ID NO: 25);

cugagaugcagguacauccagcugaugaguccaaaauaggacgaaacgccuucgggccuucguggaauuc
cacugcuauccac (SEQ ID NO: 26);

cugagaugcagguacauccagcugaugaguccaaaauaggacgaaacgccuucgggccuacuggaauuc
cacugcuauccac (SEQ ID NO: 27);

cugagaugcagguacauccagcugaugaguccuucgggacgaaacgccuucggguguccuggaaucca
cugcuauccac (SEQ ID NO: 28);

5 cugagaugcagguacauccagcugaugaguccuaaaacauaccagauuucgaucuggagaggugaag
aaucgaccaccuaggacgaaacgcgcucggugcguccuggaauccacugcuauccac (SEQ ID NO: 30);

cugagaugcagguacauccagcugaugaguccaaaauaggacgaaacgccuucggguguccuggaau
ccacugcuauccac (SEQ ID NO: 31);

cugagaugcagguacauccagcugaugaguccaaaauaggacgaaacgccuucggguguccuggaau
ccacugcuauccac (SEQ ID NO: 32);

* cugagaugcagguacauccagcugaugaguccaaaauaggacgaaacgccuucggguguccuggaau
ccacugcuauccac (SEQ ID NO: 33); *

cugagaugcagguacauccagcugaugaguccaaaauaggacgaaacgccuucggguguccuggaau
ccacugcuauccac (SEQ ID NO: 34);

10 cugaggugcagguacauccacugacgaguccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggau
uccacugcuauccac (SEQ ID NO: 35);

cugaggugcagguacauccacugacgaguccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggau
accacugcuauccac (SEQ ID NO: 36);

cugaggugcagguacauccacugacgaguccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggau
cccacugcuauccac (SEQ ID NO: 37);

cugaggugcagguacauccacugacgaguccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggau
gccacugcuauccac (SEQ ID NO: 38);

cugaggugcagguacauccacugacgaguccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggau
uacacugcuauccac (SEQ ID NO: 39);

15 cugaggugcagguacauccacugacgaguccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggau
ugcacugcuauccac (SEQ ID NO: 40);

cugaggugcagguacauccacugacgaguccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggau
uucacugcuauccac (SEQ ID NO: 41);

cugaggugcagguacauccacugacgaguccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggau
ucaacugcuauccac (SEQ ID NO: 42);

cugaggugcagguacauccacugacgaguccaaaauaggacgaaacgcgcucggugcgucugggau
ucgacugcuauccac (SEQ ID NO: 43);

cugaggugcagguacauccacugacgaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucugggau
uccacugcuauccac (SEQ ID NO: 44);

cugaccagaugguacauccagcugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcguccuggau
uccacaucuggcac (SEQ ID NO: 45);

cugaccagaugguacauccagcugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcguccuggau
acuacaucuggcac (SEQ ID NO: 46);

cugagaugcagguacauccaucugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucauggau
uccacugcuauccac (SEQ ID NO: 50);

5 cugagaugcagguacaucccucugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucagggau
uccacugcuauccac (SEQ ID NO: 51);

cugagaugcagguacauccuacugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucuaggau
uccacugcuauccac (SEQ ID NO: 52);

cugagaugcagguacauccacugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucugggau
uccacugcuauccac (SEQ ID NO: 53);

cugagaugcagguacauccgucugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucacggau
uccacugcuauccac (SEQ ID NO: 54);

cugaccagaugguacauccagcugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcguccuggau
uccacaucuggcac (SEQ ID NO: 55);

10 cugaccaggugguacauccagcugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcguccuggau
uccacaucuggcac (SEQ ID NO: 56);

cugaccaggugguacaucccucugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucagggau
uccacaucuggcac (SEQ ID NO: 57);

cugaccaggugguacauccacugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucugggau
uccacaucuggcac (SEQ ID NO: 58);

cugaggugcagguacauccagcugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcguccuggau
uccacugcuauccac (SEQ ID NO: 59);

cugaggugcagguacauccacugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucugggau
uccacugcuauccac (SEQ ID NO: 60);

15 cugaggugcagguacauccagcuggugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcguccuggau
uccacugcuauccac (SEQ ID NO: 61);

cugaggugcagguacauccagcuggugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcguccuggau
uccacugcuauccac (SEQ ID NO: 62); and

cugagaugcuuacgcgucugaugaguccaaaauaggacgaaacgcgcuccggugcgucacgcguugu
ugcuauccac (SEQ ID NO: 63).

2. Ribozima autoescindible que comprende la secuencia nucleotídica de:

cugagaugcagguacaucagcugaNgaguccaaauaggacgaaacgcnggguccugauuccacugca uccac (SEQ ID n.º 64), en donde,

cada N es independientemente cualquier nucleótido;

cada A, U, G y C es adenosina, uridina, guanosina y citidina, respectivamente; y

5 n es de 3 a 40 nucleótidos;

y, de manera optativa, en donde la ribozima autoescindible comprende además otros nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia nucleotídica de la SEQ ID n.º 64.

3. Ribozima autoescindible de acuerdo con la reivindicación 2, que tiene la secuencia nucleotídica de:

10 cugagaugcagguacaucagcugaNgaguccaaauaggacgaaacgcucgggguccugauuccacu gcauccac (SEQ ID n.º 65), en donde,

N es cualquier nucleótido;

cada A, U, G y C es adenosina, uridina, guanosina y citidina, respectivamente;

y, de manera optativa, en donde la ribozima autoescindible comprende además otros nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia nucleotídica de la SEQ ID n.º 65;

15 y además, de manera optativa, en donde N es el nucleótido U.

4. Ácido nucleico que codifica una ribozima autoescindible de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.

5. Ácido nucleico que codifica (i) una ribozima autoescindible de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 y (ii) un aptámero en una posición de tal forma que la actividad escisora de dicha ribozima autoescindible se pueda modular mediante la fijación de un efector al aptámero.

20 6. Molécula polinucleotídica recombinante que comprende:

(a) un promotor;

(b) un ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico; y

25 (c) un ácido nucleico que codifica una ribozima autoescindible de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) están operativamente unidos al promotor y la transcripción del ácido nucleico de (b) y del ácido nucleico de (c) produce una molécula de ARN que comprende dicha ribozima autoescindible y un ARNm que codifica dicho producto de ácido nucleico, en donde dicha ribozima autoescindible es capaz de escindir dicha molécula de ARN de forma intramolecular.

30 7. Molécula polinucleotídica recombinante de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el ácido nucleico de (c) comprende además un ácido nucleico que codifica un aptámero que está en una posición de tal forma que la actividad escisora de la ribozima autoescindible se puede regular por la fijación de un efector al aptámero;

y en donde, de forma optativa, o:

(a) el ácido nucleico de (c) codifica al menos dos de las ribozimas autoescindibles; o

(b) la ribozima autoescindible es tal que además, de forma optativa:

(i) la molécula polinucleotídica recombinante está presente en el genoma de una célula; o

35 (ii) la molécula polinucleotídica recombinante está presente en un vector.

8. Célula hospedadora aislada:

(a) transformada con el ácido nucleico de la reivindicación 4;

(b) que comprende la molécula polinucleotídica recombinante de acuerdo con la reivindicación 7; y en donde de forma optativa:

40 (i) la célula es una célula de mamífero; o

(ii) la célula comprende además un agente que inhibe la escisión de la ribozima autoescindible, en donde el agente se selecciona del grupo que consiste en inhibidores aminoglucósidos, toyocamicina, 8-azaadenosina, sangivamicina, tubercidina, monofosfato cíclico de tubercidina, monofosfato de tubercidina, trifosfato de tubercidina, nebularina, nucleósido tricíclico, 5-fluorouridina, 5-bromouridina, 5-fluorouracilo,

Syto-83, bromuro de etidio, naranja de acridina y un oligonucleótido antisentido de dicha ribozima autoescindible; o

(c) que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4.

9. Vector vírico o virus, que comprende:

5 (a) un promotor;

(b) un ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico;

(c) un ácido nucleico que codifica una ribozima autoescindible de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, y en donde el ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) están operativamente unidos al promotor y la transcripción del ácido nucleico de (b) y del ácido nucleico de (c) produce una molécula de ARN que comprende dicha ribozima autoescindible y un ARNm que codifica dicho producto de ácido nucleico, en donde dicha ribozima autoescindible es capaz de escindir dicha molécula de ARN de forma intramolecular.

10. Vector vírico o virus de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el ácido nucleico de (c) comprende además un ácido nucleico que codifica un aptámero que está en una posición de tal forma que la actividad escisora de dicha ribozima autoescindible se puede regular por la fijación de un efector a dicho aptámero;

15 11. Oligonucleótido antisentido modificado de una ribozima autoescindible de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.

12. Oligonucleótido antisentido modificado de acuerdo con la reivindicación 11:

(a) seleccionado del grupo que consiste en: morfolino, fosforotioato de ARN, ARN 2'-O-metilado, y fosforotioato de ARN 2'-O-metoxietilado; o

20 (b) cuyo oligonucleótido antisentido modificado aparea sus bases con una región de la ribozima autoescindible tal y como se presenta en gugcguccuggauuccacugcuauc (SEQ ID n.º 67).

13. Kit para regular la expresión génica, que comprende un ácido nucleico que comprende:

(a) una secuencia que codifica una ribozima autoescindible de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, y

(b) un sitio de clonación para introducir una secuencia nucleotídica deseada que se ha de transcribir operativamente unida a la secuencia que codifica dicha ribozima autoescindible.

25 14. Kit de acuerdo con la reivindicación 13,

(a) que comprende además un agente que inhibe la escisión de la ribozima autoescindible, en donde el agente se selecciona del grupo que consiste en inhibidores aminoglucósidos, toyocamicina, 8-azaadenosina, sangivamicina, tubercidina, monofosfato cíclico de tubercidina, monofosfato de tubercidina, trifosfato de tubercidina, nebularina, nucleósido tricíclico, 5-fluorouridina, 5-bromouridina, 5-fluorouracilo, Syto-83, bromuro de etidio, naranja de acridina y un oligonucleótido antisentido de dicha ribozima autoescindible, en donde la transcripción de dicha secuencia nucleotídica deseada está inhibida en ausencia del inhibidor; o

(b) en donde el ácido nucleico comprende al menos dos de dichas ribozimas autoescindibles.

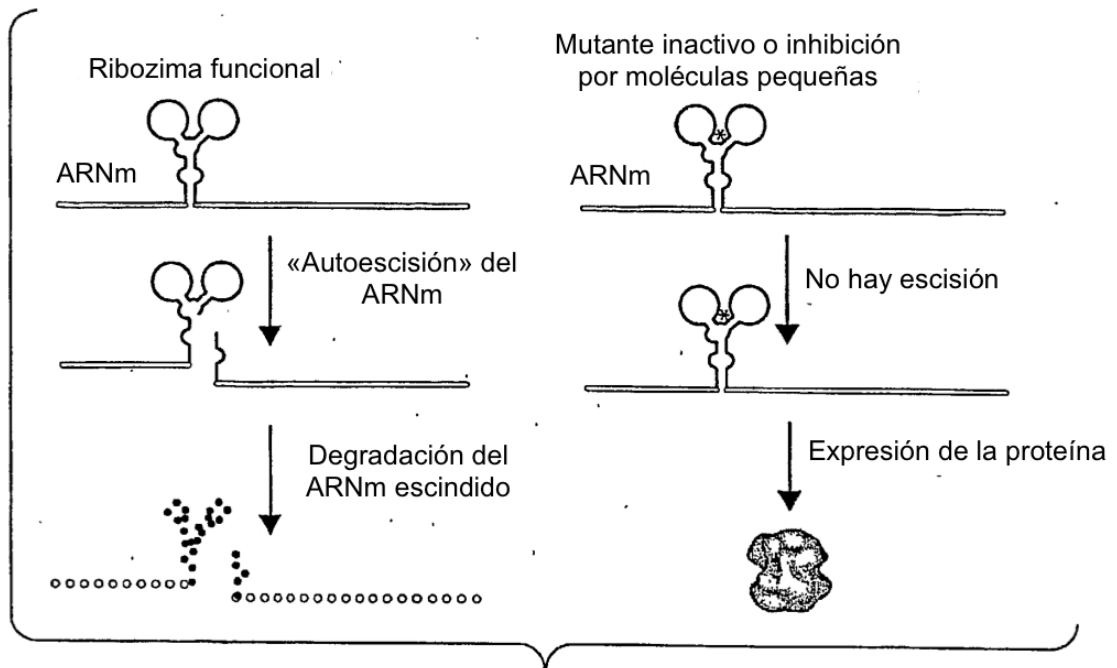


Fig. 1A

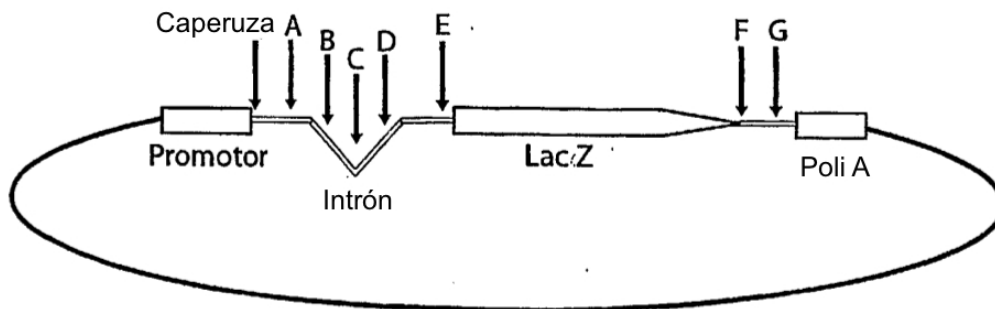


Fig. 1B

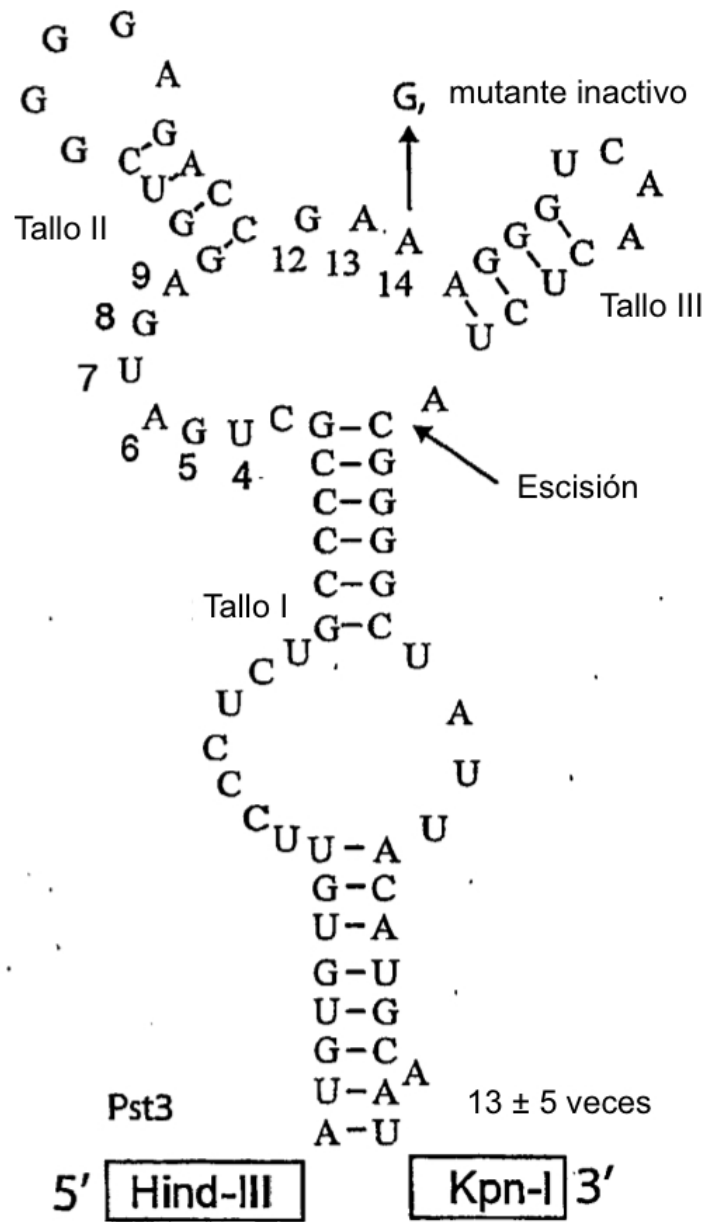


Fig. 1C

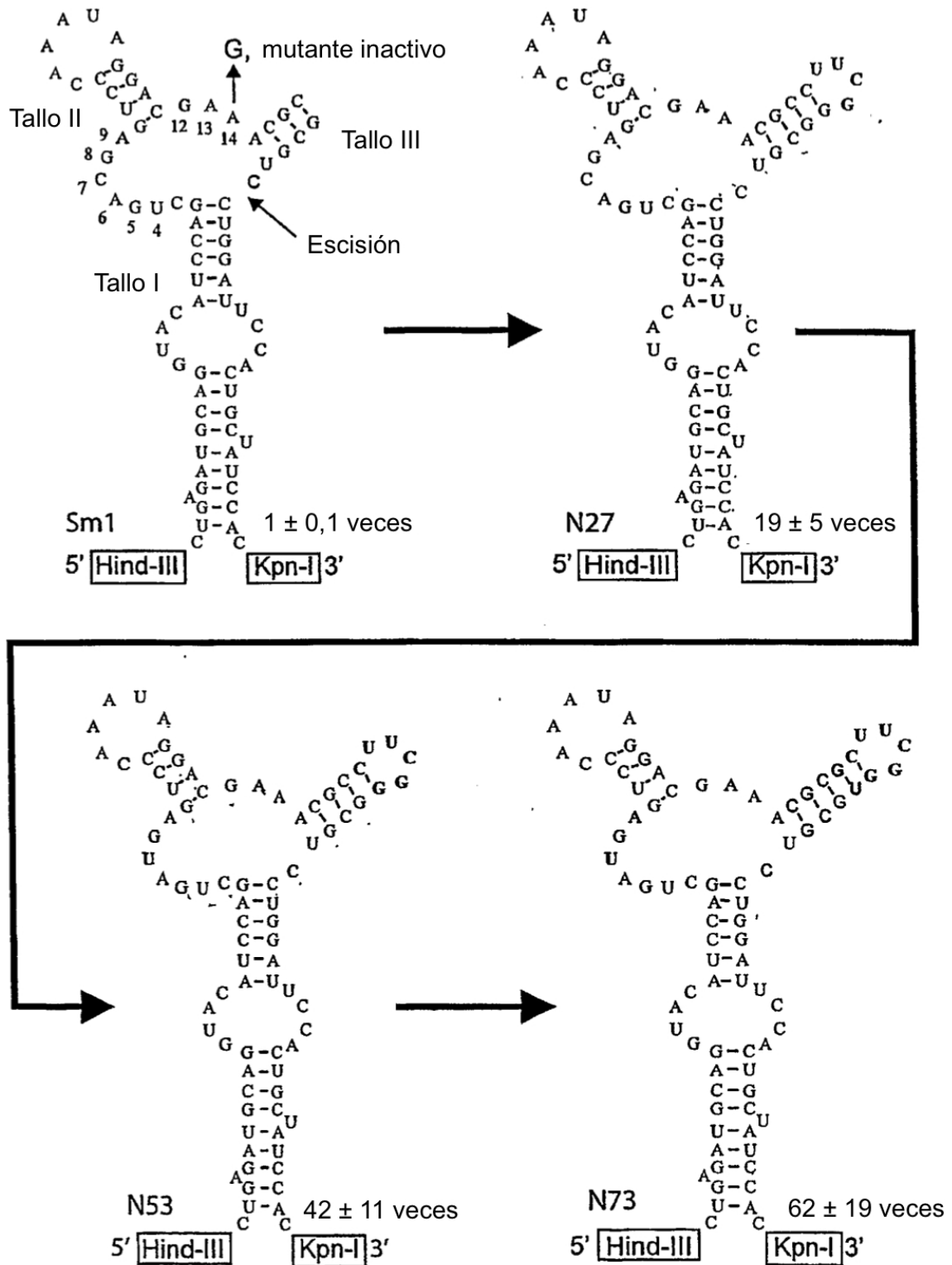


Fig. 1D

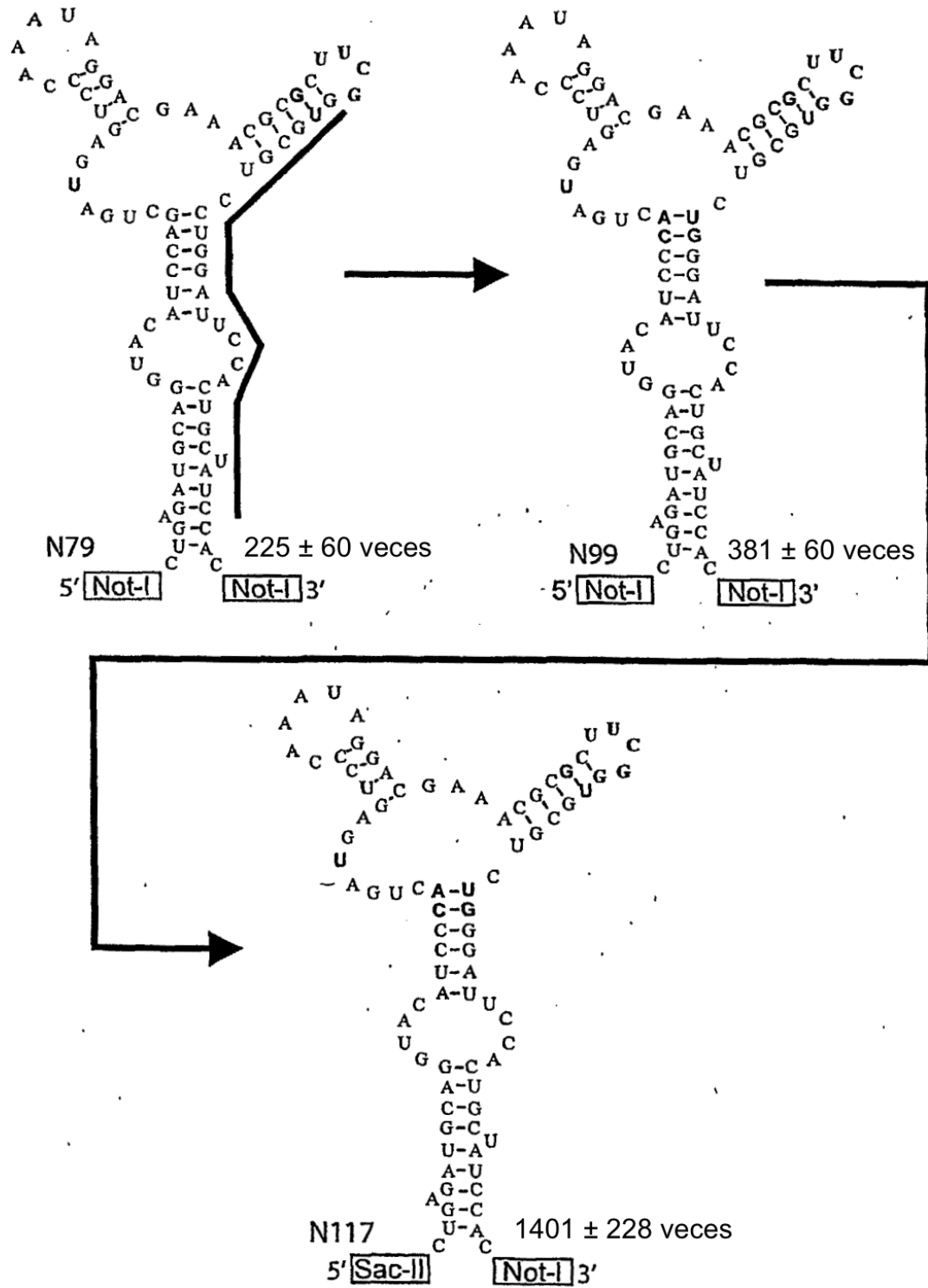


Fig. 1E

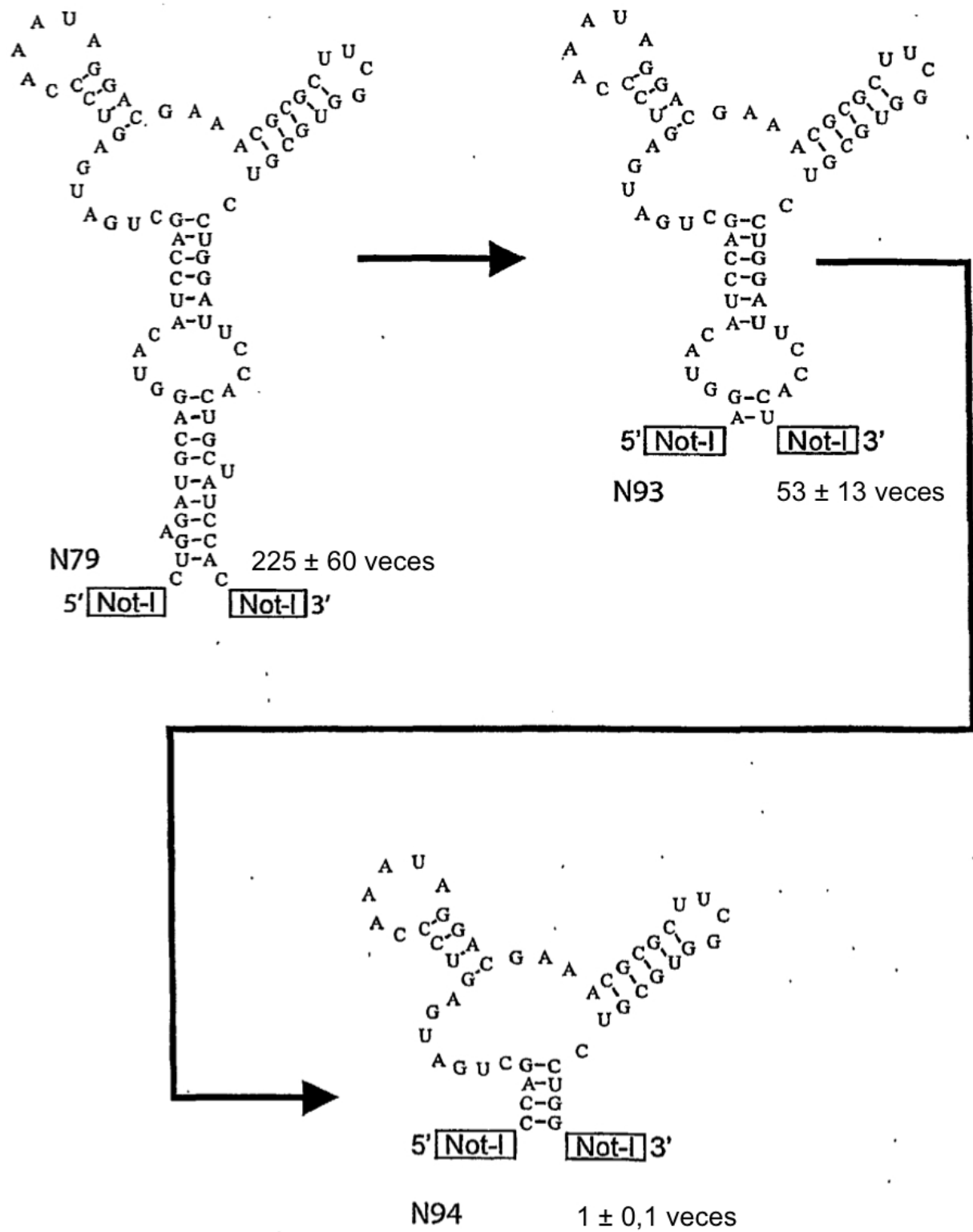


Fig. 1F

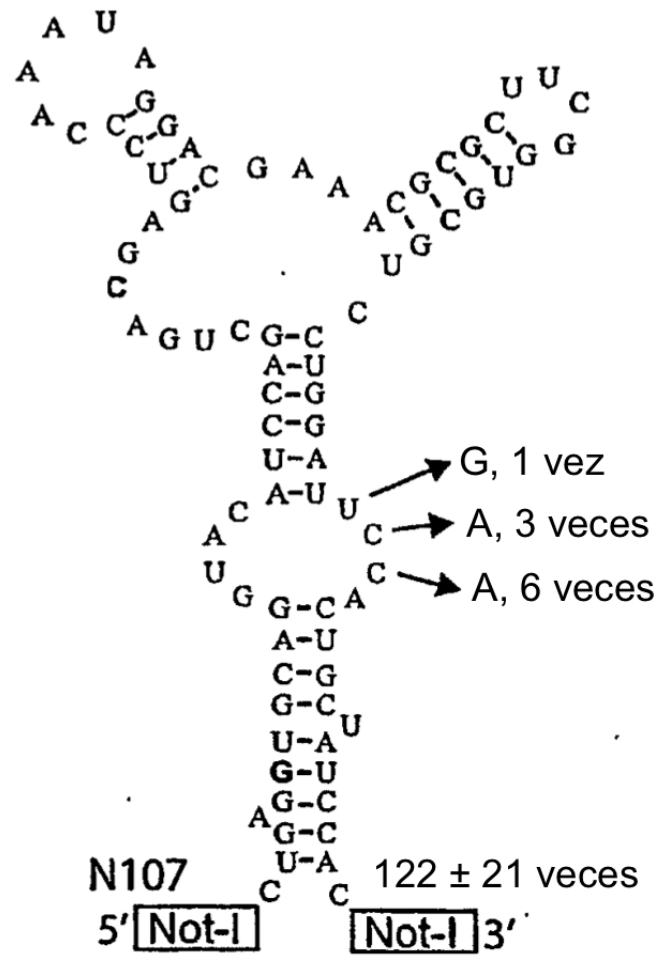


Fig. 1G

Tipo de células	Riñón	Cáncer de cuello de útero	Melanoma	Ovario	Fibroblasto
	293T	Hela	B16	CHO	3T3
Ribozima funcional	0,27	0,00	0,03	0,00	0,00
Ribozima inactiva	109,6	8,8	22,8	10,0	7,6
Veces de disminución	403	N/A*	671	N/A*	N/A*

* La actividad del gen indicador de la construcción de la ribozima funcional era indetectable

Fig. 2A

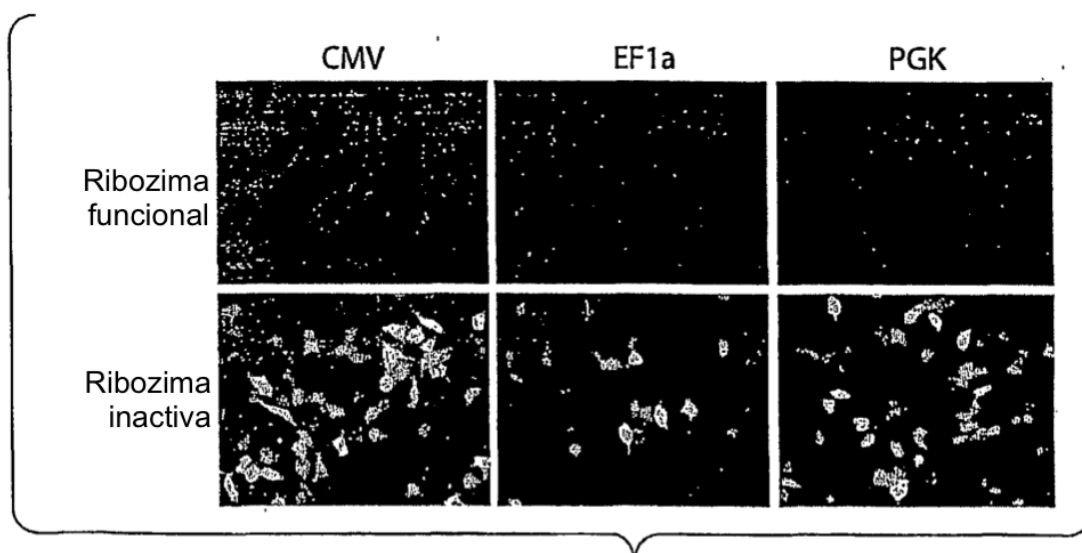


Fig. 2B

Posición	5' UTR Cap	A	E	Intrón			3' UTR	
				B	C	D	F	G
N79 simple	102 ±17	62 ±19	225 ±60	2 ±1	3 ±1	3 ±1	4 ±2	3 ±1
N79 doble	205 ±56	44 ±7	3183 ±717				6 ±1	

Fig. 2C

Inducción	Veces	Por porcentaje
N79 simple	31	27%
	23	35%
	69	34%
N79 doble	2012	38%
	851	50%
	110	5%
	200	5%

Fig. 3A

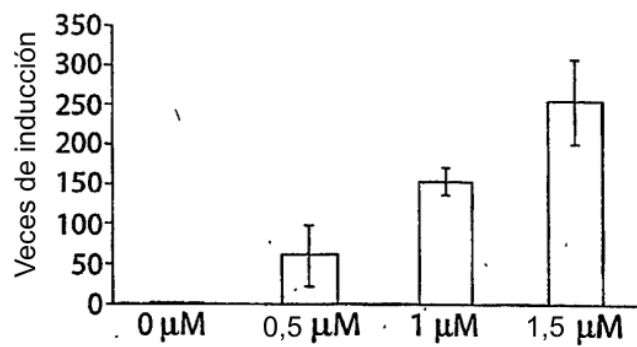


Fig. 3B

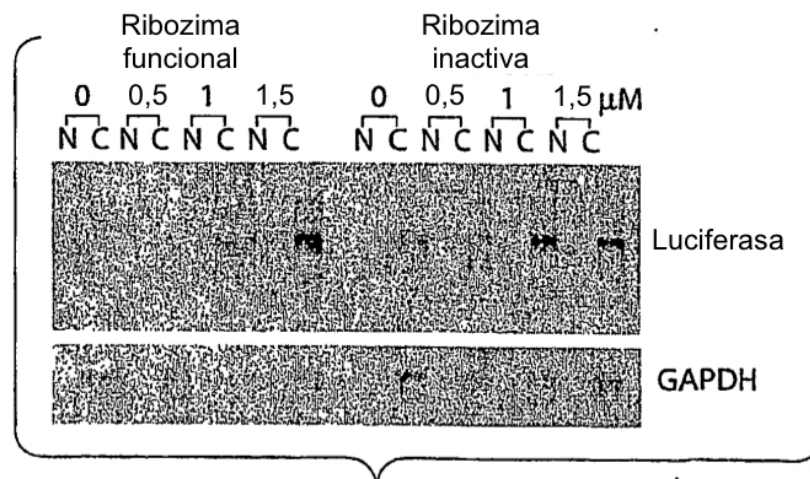


Fig. 3C

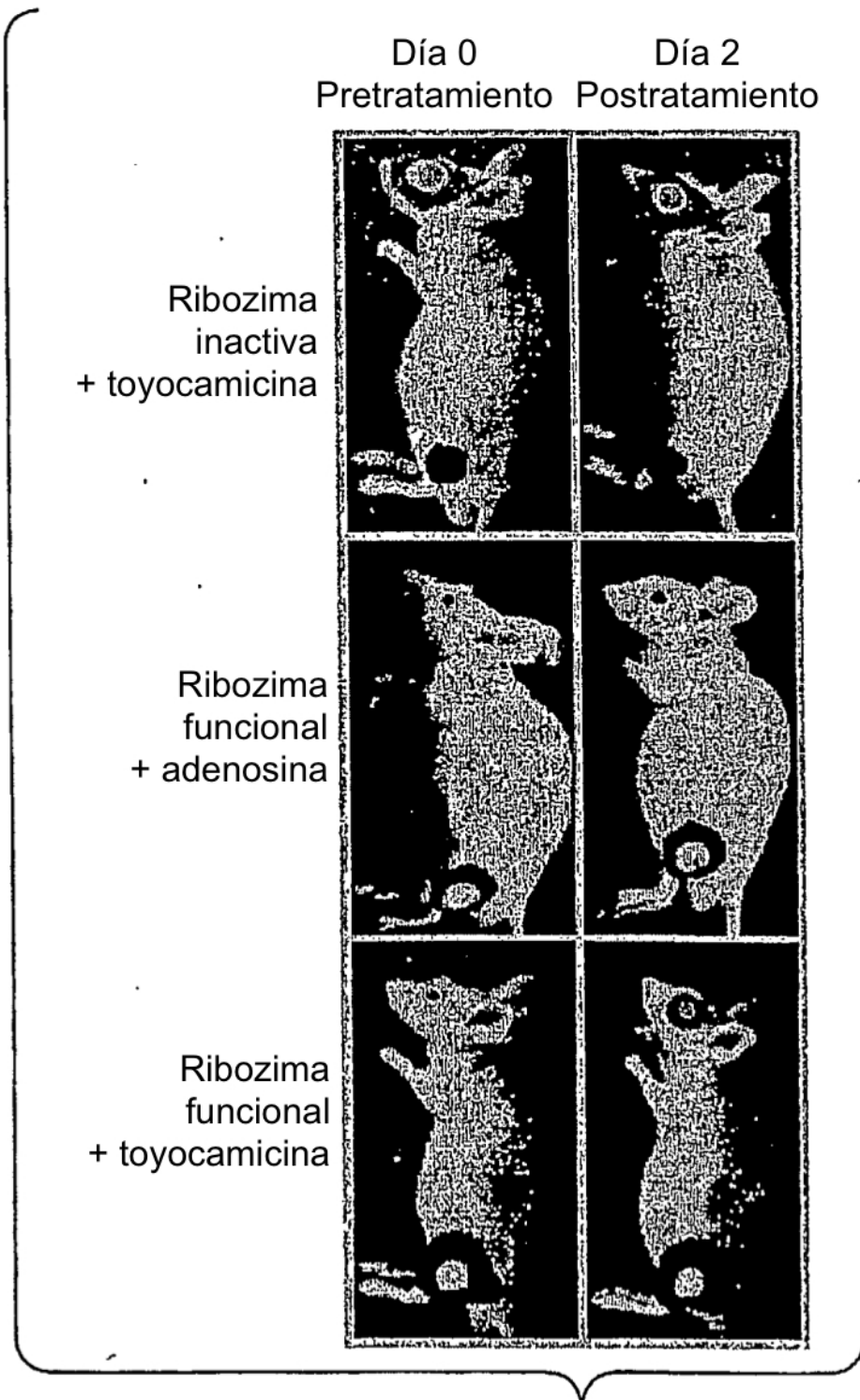


Fig. 4

Modificaciones principales que mejoran la actividad de la ribozima de esquistosoma

Secuencia de N79 de esquistosoma: CUGAG AUGCAGGUACAUC CAGCUGAUGAGUCCCAAUAAGGACGAAACGGCgcuucggucCGUCCUGGAUCCACUGCUAUCCAC

Veces de diferencia (Mutante frente a silvestre)	Nombre de la ribozima									
	Tallo I distal		Tallo I proximal		Centro		Tallo II		Tallo I distal	
	5'	3'	5'	3'	5'	3'	5'	3'	5'	3'
0	N5 (E.squist. natural)	CUGAGAGUGCAGGUAACAUCACGUGACGAGUCCAAUAAGGACGAAACGC							GCGUCUGGAUCCACUGCUAUCCAC	
19	N27								c uucg g	
52	N53		u						c uucg g	
71	N73		u						gcuucggu	
266	N79		u						gcuucggu	
410	N99		ca		u				gcuucggu ug	
1400	N117		ca		u				gcuucggu ug	

Fig. 5A

Las modificaciones en el sitio de escisión GUC generalmente disminuyen la actividad de la ribozima de esquistosoma

		Tallo I										Tallo I																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
		distal					proximal					distal					proximal																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
		Lazo I	Centro	Tallo II	Lazo II	Tallo II	Centro	Tallo III	Lazo III	Tallo III	Centro	Tallo IV	Lazo IV	Tallo IV	Centro	Tallo V	Lazo V	Tallo V	Centro	Tallo VI	Lazo VI	Tallo VI	Centro	Tallo VII	Lazo VII	Tallo VII	Centro	Tallo VIII	Lazo VIII	Tallo VIII	Centro	Tallo IX	Lazo IX	Tallo IX	Centro	Tallo X	Lazo X	Tallo X	Centro	Tallo XI	Lazo XI	Tallo XI	Centro	Tallo XII	Lazo XII	Tallo XII	Centro	Tallo XIII	Lazo XIII	Tallo XIII	Centro	Tallo XIV	Lazo XIV	Tallo XIV	Centro	Tallo XV	Lazo XV	Tallo XV	Centro	Tallo XVI	Lazo XVI	Tallo XVI	Centro	Tallo XVII	Lazo XVII	Tallo XVII	Centro	Tallo XVIII	Lazo XVIII	Tallo XVIII	Centro	Tallo XIX	Lazo XIX	Tallo XIX	Centro	Tallo XX	Lazo XX	Tallo XX	Centro	Tallo XXI	Lazo XXI	Tallo XXI	Centro	Tallo XXII	Lazo XXII	Tallo XXII	Centro	Tallo XXIII	Lazo XXIII	Tallo XXIII	Centro	Tallo XXIV	Lazo XXIV	Tallo XXIV	Centro	Tallo XXV	Lazo XXV	Tallo XXV	Centro	Tallo XXVI	Lazo XXVI	Tallo XXVI	Centro	Tallo XXVII	Lazo XXVII	Tallo XXVII	Centro	Tallo XXVIII	Lazo XXVIII	Tallo XXVIII	Centro	Tallo XXIX	Lazo XXIX	Tallo XXIX	Centro	Tallo XXX	Lazo XXX	Tallo XXX	Centro	Tallo XXXI	Lazo XXXI	Tallo XXXI	Centro	Tallo XXXII	Lazo XXXII	Tallo XXXII	Centro	Tallo XXXIII	Lazo XXXIII	Tallo XXXIII	Centro	Tallo XXXIV	Lazo XXXIV	Tallo XXXIV	Centro	Tallo XXXV	Lazo XXXV	Tallo XXXV	Centro	Tallo XXXVI	Lazo XXXVI	Tallo XXXVI	Centro	Tallo XXXVII	Lazo XXXVII	Tallo XXXVII	Centro	Tallo XXXVIII	Lazo XXXVIII	Tallo XXXVIII	Centro	Tallo XXXIX	Lazo XXXIX	Tallo XXXIX	Centro	Tallo XL	Lazo XL	Tallo XL	Centro	Tallo XLI	Lazo XLI	Tallo XLI	Centro	Tallo XLII	Lazo XLII	Tallo XLII	Centro	Tallo XLIII	Lazo XLIII	Tallo XLIII	Centro	Tallo XLIV	Lazo XLIV	Tallo XLIV	Centro	Tallo XLV	Lazo XLV	Tallo XLV	Centro	Tallo XLVI	Lazo XLVI	Tallo XLVI	Centro	Tallo XLVII	Lazo XLVII	Tallo XLVII	Centro	Tallo XLVIII	Lazo XLVIII	Tallo XLVIII	Centro	Tallo XLIX	Lazo XLIX	Tallo XLIX	Centro	Tallo L	Lazo L	Tallo L	Centro	Tallo LI	Lazo LI	Tallo LI	Centro	Tallo LII	Lazo LII	Tallo LII	Centro	Tallo LIII	Lazo LIII	Tallo LIII	Centro	Tallo LIV	Lazo LIV	Tallo LIV	Centro	Tallo LV	Lazo LV	Tallo LV	Centro	Tallo LVI	Lazo LVI	Tallo LVI	Centro	Tallo LVII	Lazo LVII	Tallo LVII	Centro	Tallo LVIII	Lazo LVIII	Tallo LVIII	Centro	Tallo LIX	Lazo LIX	Tallo LIX	Centro	Tallo LX	Lazo LX	Tallo LX	Centro	Tallo LXI	Lazo LXI	Tallo LXI	Centro	Tallo LXII	Lazo LXII	Tallo LXII	Centro	Tallo LXIII	Lazo LXIII	Tallo LXIII	Centro	Tallo LXIV	Lazo LXIV	Tallo LXIV	Centro	Tallo LXV	Lazo LXV	Tallo LXV	Centro	Tallo LXVI	Lazo LXVI	Tallo LXVI	Centro	Tallo LXVII	Lazo LXVII	Tallo LXVII	Centro	Tallo LXVIII	Lazo LXVIII	Tallo LXVIII	Centro	Tallo LXIX	Lazo LXIX	Tallo LXIX	Centro	Tallo LXX	Lazo LXX	Tallo LXX	Centro	Tallo LXXI	Lazo LXXI	Tallo LXXI	Centro	Tallo LXXII	Lazo LXXII	Tallo LXXII	Centro	Tallo LXXIII	Lazo LXXIII	Tallo LXXIII	Centro	Tallo LXXIV	Lazo LXXIV	Tallo LXXIV	Centro	Tallo LXXV	Lazo LXXV	Tallo LXXV	Centro	Tallo LXXVI	Lazo LXXVI	Tallo LXXVI	Centro	Tallo LXXVII	Lazo LXXVII	Tallo LXXVII	Centro	Tallo LXXVIII	Lazo LXXVIII	Tallo LXXVIII	Centro	Tallo LXXIX	Lazo LXXIX	Tallo LXXIX	Centro	Tallo LXXX	Lazo LXXX	Tallo LXXX	Centro	Tallo LXXXI	Lazo LXXXI	Tallo LXXXI	Centro	Tallo LXXXII	Lazo LXXXII	Tallo LXXXII	Centro	Tallo LXXXIII	Lazo LXXXIII	Tallo LXXXIII	Centro	Tallo LXXXIV	Lazo LXXXIV	Tallo LXXXIV	Centro	Tallo LXXXV	Lazo LXXXV	Tallo LXXXV	Centro	Tallo LXXXVI	Lazo LXXXVI	Tallo LXXXVI	Centro	Tallo LXXXVII	Lazo LXXXVII	Tallo LXXXVII	Centro	Tallo LXXXVIII	Lazo LXXXVIII	Tallo LXXXVIII	Centro	Tallo LXXXIX	Lazo LXXXIX	Tallo LXXXIX	Centro	Tallo LXXXX	Lazo LXXXX	Tallo LXXXX	Centro	Tallo LXXXXI	Lazo LXXXXI	Tallo LXXXXI	Centro	Tallo LXXXXII	Lazo LXXXXII	Tallo LXXXXII	Centro	Tallo LXXXXIII	Lazo LXXXXIII	Tallo LXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXIV	Lazo LXXXXIV	Tallo LXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXV	Lazo LXXXXV	Tallo LXXXXV	Centro	Tallo LXXXXVI	Lazo LXXXXVI	Tallo LXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXVII	Lazo LXXXXVII	Tallo LXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXVIII	Lazo LXXXXVIII	Tallo LXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXIX	Lazo LXXXXIX	Tallo LXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXX	Lazo LXXXXX	Tallo LXXXXX	Centro	Tallo LXXXXXI	Lazo LXXXXXI	Tallo LXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXII	Lazo LXXXXXII	Tallo LXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXIII	Lazo LXXXXXIII	Tallo LXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXIV	Lazo LXXXXXIV	Tallo LXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXV	Lazo LXXXXXV	Tallo LXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXVI	Lazo LXXXXXVI	Tallo LXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXVII	Lazo LXXXXXVII	Tallo LXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXVIII	Lazo LXXXXXVIII	Tallo LXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXIX	Lazo LXXXXXIX	Tallo LXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXX	Lazo LXXXXXX	Tallo LXXXXXX	Centro	Tallo LXXXXXXI	Lazo LXXXXXXI	Tallo LXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXII	Lazo LXXXXXXII	Tallo LXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXV	Lazo LXXXXXXV	Tallo LXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXX	Lazo LXXXXXXX	Tallo LXXXXXXX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXXXXXV	Centro	Tallo LXXXXXXXVI	Lazo LXXXXXXXVI	Tallo LXXXXXXXVI	Centro	Tallo LXXXXXXXVII	Lazo LXXXXXXXVII	Tallo LXXXXXXXVII	Centro	Tallo LXXXXXXXVIII	Lazo LXXXXXXXVIII	Tallo LXXXXXXXVIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIX	Lazo LXXXXXXXIX	Tallo LXXXXXXXIX	Centro	Tallo LXXXXXXXI	Lazo LXXXXXXXI	Tallo LXXXXXXXI	Centro	Tallo LXXXXXXXII	Lazo LXXXXXXXII	Tallo LXXXXXXXII	Centro	Tallo LXXXXXXXIII	Lazo LXXXXXXXIII	Tallo LXXXXXXXIII	Centro	Tallo LXXXXXXXIV	Lazo LXXXXXXXIV	Tallo LXXXXXXXIV	Centro	Tallo LXXXXXXXV	Lazo LXXXXXXXV	Tallo LXXXX

Fig. 5B

Las modificaciones en el lazo II generalmente disminuyen la actividad de la ribozima de esquistosoma

		Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I										Tallo I									
--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Algunas modificaciones en el lazo III generalmente disminuyen la actividad de la ribozima de esquistosoma

Veces de diferencia (Mutante frente a silvestre)	Nombre de la ribozima	Secuencia
5'	52	5' 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83
	N53	CUGAGAGUCGAGGUACAUCACGUGAGUCCCAAAUAGGACGAAACGCC UUCG GGCGUCCUGGAUCCACUGCUGCUAUCCAC
26	N64	c
13	N64-2	u
10	N64-4	a
4	N64-5	g

Fig. 5D

Las modificaciones en el lazo I disminuyen la actividad de la ribozima de esquistosoma

Veces de diferencia (Mutante frente a silvestre)																																																																																			
Nombre de la ribozima																																																																																			
Tallo I Tallo I distal Lazo I Tallo I proximal Centro Tallo II Lazo II Tallo II proximal Centro Tallo III Lazo III Tallo III proximal Centro Tallo I distal																																																																																			
5'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83
CUGAGGGUGCAGGUACAUC																CGGACGAAACGGCGUUCGGUGG																GUCUGGGAUUCCACUGGCUAUC																																																			
61 to 107	N107																																																																																		
2	N106-ACC	a																																																																																	
5	N108-CCC	c																																																																																	
0.3	N108-GCC	g																																																																																	
3	N108-UAC	a																																																																																	
3	N108-UGC	g																																																																																	
14	N108-UUC	u																																																																																	
6	N108-UCA	a																																																																																	
7	N108-UCG	g																																																																																	
20	N108-UCU	u																																																																																	

Veces de diferencia (Mutante frente a silvestre)																																																																																			
Nombre de la ribozima																																																																																			
Tallo I Tallo I distal Lazo I Tallo I proximal Centro Tallo II Lazo II Tallo II proximal Centro Tallo III Lazo III Tallo III proximal Centro Tallo I distal																																																																																			
5'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83
CUGACCAGAUUGGUACAUC																CGGACGAAACGGCGUUCGGUGG																GUCUGGGAUUCCACAUUCUGG / CAC																																																			
69	N95																																																																																		
2	N102	a u																																																																																	

Fig. 5E

Las modificaciones en tallo I disminuyen la actividad de la ribozima de esquistosoma, salvo para N99

		Tallo I										Tallo I									
		Tallo I distal		Lazo I proximal		Centro		Tallo II proximal		Lazo II		Centro		Tallo II distal		Lazo III proximal		Centro		Lazo III distal	
Veces de diferencia		5' 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83																			
(Mutante frente a silvestre)																					
Nombre de la ribozima																					
266	N79	CUGAGAUGCAGGUA CAUCCAGCUGAUGAGUCCCAAUAGGACGAAACGGCGUUCGGUGGUGGUGGUAUCCACUGGCUAUCCAC																			
57	N93	////////////////																			
1	N94	////////////////																			
17	N96			u														a			
145	N97			cu														ag			
48	N98			ua														ua			
410	N99			ca														ug			
100	N100			gu														ac			
69	N95	cca au																au gg/			
150	N101	cca gu																au gg/			
55	N103	cca gu		cu														ag		au gg/	
64	N104	cca gu		ca														ug		au gg/	
124	N105	g																			
86	N106	g		ca														ug			
99	N107	g		g																	
171	cd28-N1	YYYYYYYY																Z=auaucuggagaggugaagaauucgaccaccuaggc		ZZZZZZZZZZ	
		Y=gcuaaaacauaccagau																			
		Deleción =/ B=uuuacgcu																DDDDDDDDDDDD		D=acgcguuguu	
		Doxv3N		BBBBBBBBBBBB																	

Fig. 5F

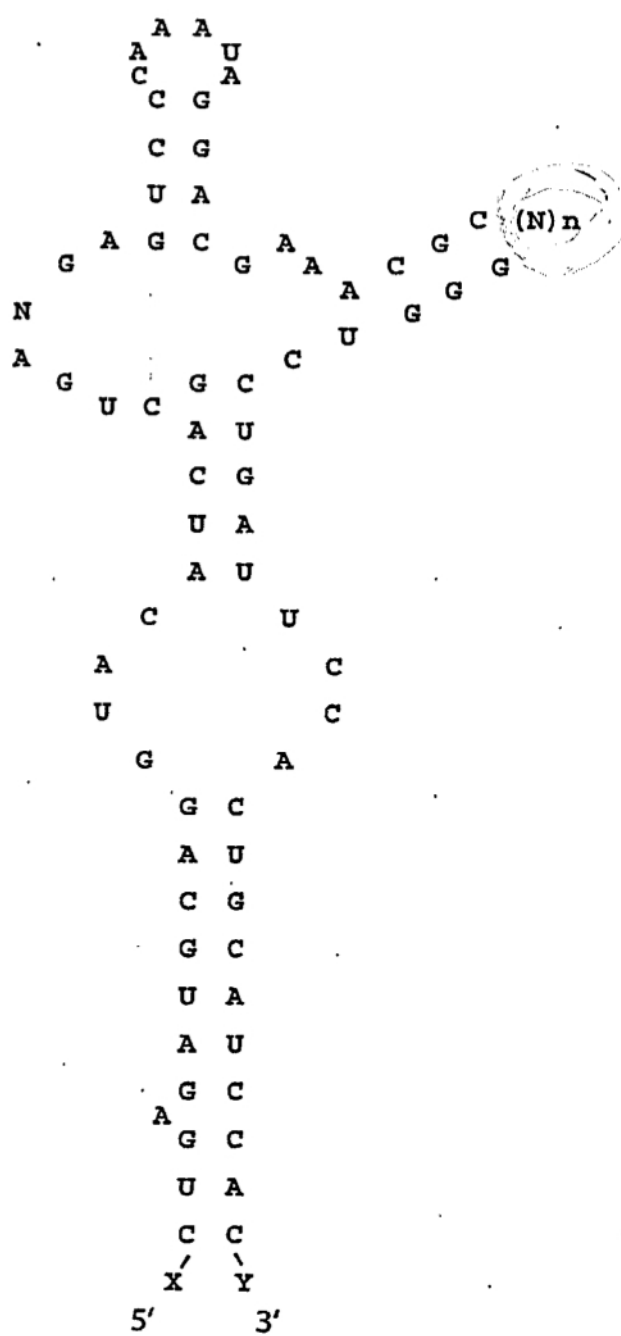


Fig. 6

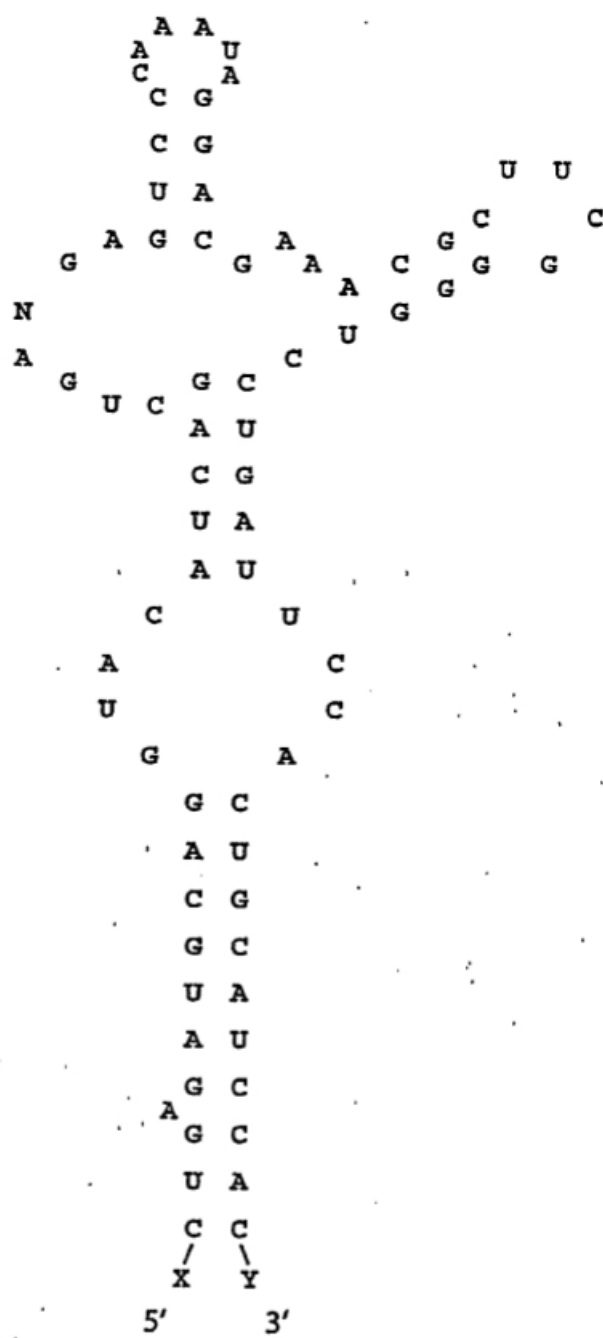


Fig. 7

Secuencia de HDM-nLacZ

AGCTTGGCCCATTCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATT
 ACCGCCATGT TGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCCATAGCCCATATATGG
 AGTTCGCGT TACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTCAGCTCAATAATG
 ACGTATGTTT CCATAGTAACGCCAATAGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTT
 GGCAGTACAT CAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATG
 CCCAGTACAT GACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG
 TTTTGGCAGT ACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTCAGCTCAATGG
 GAGTTTGT TGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGTAACAACTCCGCCCATTCAGCGAAATGGGCGGTA
 GCGGTGTACG GTGGGAGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGT
 TTTGACCTCC ATAGAAGACACCGGACCGATCCAGCCTCCCTCGAAGCTGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTCTATGG
 GACCTTGAT GTTTCTTTCCCTTCTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCTATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACACAT
 ATTGACCAAA TCAGGGTAATTTGCAATTTGTAATTTTAAAAATGCTTTCTTCTTTTAAATATACTTTTGTGTATCTTA
 TTTCTAATAC TTTCCCTAATCTTTCTTTTCCAGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTGACCATTTCTAAAGA
 ATAACAGTGA TAATTTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTTGTAAGTGTG
 TAAGAGGTTT CATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGAT
 TATTCTGAGT CCAAGCTAGGCCCTTTTGTCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACGCTGC
 TGGTCTGTGT GCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTCGCGGGCGGCGCCATGGCGCCAAAAAGAAAGAAAGGTAA
 AGATCCCGG GAATTCACCTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTT
 GCAGCACAT CCCCTTTCCGACGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCT
 GAATGGCGAA TGGCGCTTTGCGCTGTTTCCGGCACAGAGCGGTGCGGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCTGAGG
 CCGTACTGT CGTCGTCCTCAAACCTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATT
 ACGGTCAATC CGCCGTTTGTTCACGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCT
 ACAGGAAGGC CAGACGCGAATATTTTGTATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTTGTTGCAACGGGCGCTGGGTGCGTT
 ACGGCCAGGA CAGTCGTTTGCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTACGCGCGGAGAAAACCGCTCGCGGTGATG
 GTGCTGCGCT GGAGTGACGCGAGTTATCTGGAAGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCGTT
 GCTGCATAAA CCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTTGCCACTCGCTTAAATGATGATTTTCCGCGCGCTGTACTGG
 AGGCTGAAGT TCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTGAACCTACCGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGGTGAAACGCGAGGTC
 GCCAGCGGA CCGCGCTTTCCGGCGGTGAAATATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCGGATCGCGTCACACTACGTCTGAA
 CGTCGAAAAC CCGAAACTGTGGAGCGCGGAAATCCCGAATCTCTATCGTGGTGGTTGAACTGCACACCGCCGACGGCA
 CGCTGATTGA AGCAGAAGCCTGCGATGTCGGTTTCCGCGAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGTAACGGCAAG
 CCGTTGCTGA TTCGAGGCGTTAACCGTCAGGAGCATCATCTCTGCATGGTCAGGTATGGATGAGCAGACGATGGTGCA
 GGATATCCTG CTGATGAAGCAGAACAACTTTAACGCCGTGCGCTGTTTCGCTTATCCGAACCATCCGCTGTGGTACACGC
 TGTGCGACCG CTACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAAATATTGAAACCCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACC
 GATGATCCGC GCTGGCTACCGCGATGAGCGAACCGTAACCGCAATGGTGCAGCGCGATCGTAATCACCCGAGTGTGAT
 CATCTGGTCG CTGGGGAATGAATCAGGCCACGGCGTAATCACGACGCGCTGTATCGCTGGATCAAATCTGTGATCCTT
 CCCGCCCGGT GCAGTATGAAGGCGGCGGAGCCGACACACGGCCACCGATATTATTGCCCCGATGTACGCGCGCTGGAT
 GAAGACCAGC CCTTCCCGCTGTGCCGAAATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTTCGCTACCTGGAGAGACGCGCCGCTGAT
 CCTTTGCGAA TACGCCACGCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTGGCAGGCGTTTCGTGATATCCCC
 GTTTACAGGG CGGCTTCGTCTGGGACTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAAATATGATGAAAACGGCAACCCGTGGTGGCT
 TACGGCGGTG ATTTTGGCGATACGCCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCCGACCGCACGCCGCA
 TCCAGCGCTG ACGGAAGCAAAACACAGCAGCAGTTTTCAGTTCCGTTTATCCGGGCAACCATCGAAGTGACCAGCG
 AATACCTGTT CCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGGATGGTAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAA
 GTGCCCTG ATGTCGCTCCACAAGGTAAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCGGGCAACT
 CTGGCTCACA GTACGCGTAGTGCAACCGAACCGACCGCATGGTCAGAAGCCGGGCACATCAGCGCCTGGCAGCAGTGGC
 GTCTGGCGGA AAACCTCAGTGTGACGCTCCCGCGCGCTCCACGCCATCCCGCATCTGACCACAGCGAAATGGATTTT
 TGCATCGAGC TGGGTAATAAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTACAGATGTGGATTGGCGATAAAAA
 ACAACTGCTG ACGCCGCTGCGCGATCAGTTACCCGTGCACCGCTGATAACGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCA

Fig. 8A

TTGACCCTAA CGCCTGGGTGGAACGCTGGAAGGCGGCGGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAGTGCAAGGCA
 GATACACTTG CTGATGCGGTGCTGATTACGACCGCTCACGCGTGGCAGCATCAGGGGAAAACTTATTTATCAGCCGGAA
 AACCTACCGG ATTGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGTGGCGAGCGATACACCGCATCCGGCGC
 GGATTGGCCT GAACTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAACTGGCTCGGATTAGGGCCGCAAGAAAACTATCCC
 GACCGCCTTA CTGCCGCTGTTTGGACCGCTGGGATCTGCCATTGTGAGACATGTATACCCCGTACGTCTTCCCGAGCGA
 AAACGGTCTG CGCTGCGGGACGCGCAATTGAATTATGGCCACACCAAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCC
 GCTACAGTCA ACAGCACTGATGGAACACGACCATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGAC
 GGTTCCTATA TGGGATTGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGT CAGTATCGGCGGAATCCAGCTGAGCGCCGGTCGCTA
 CCATTACCAG TTGGTCTGGTGTCAAAAATAATAAACCAGGCGAGGGGGATCCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGA
 GGGCCAGAT CTAATTCACCCACAGTGCAGGCTGCCATCAGAAAGTGGTGGTGGTGGTGAATGCCCTGGCCAC
 AAGTATCACT AAGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCTTTTGTCCCTAAGTCCAATACTAACTggg
 gggatattat gaagggccttccggagcatctggattctgcctaataaaaaacatttattttcattgcaatgatgtatttA
 AATTATTTCT GAATATTTTACTAAAAAGGGAATGTGGGAGGTGAGTGCATTTAAACATAAAGAAATGAAGAGCTAGTTT
 AAACCTGGG AAAATACACTATATCTTAACTCCATGAAAGAAGGTGAGGCTGCAACAGCTAATGCACATTGGCAACAG
 CCCCTGATGC CTATGCCTTATTCATCCCTCAGAAAAGGATTCAAGTAGAGGCTTGATTGGAGGTTAAAGTTTTGCTATG
 CTGTATTTTA CATTACTTATTGTTTTAGCTGTCTCATGAATGTCTTTCACTACCCATTGCTTATCCTGCATCTCTCA
 GCCTTGACTC CACTCAGTTCTCTTGCTTAGAGATACCACCTTTCCCTGAAGTGTTCCTTCCATGTTTTACGGCGAGATG
 GTTCTCCTC GCCTGGCCACTCAGCCTTAGTGTCTCTGTTGTCTTATAGAGGTCTACTTGAAGAAGGAAAAACAGGGG
 CATGGTTTGA CTGTCTGTGAGCCCTTCTCCCTGCCTCCCCACTCACAGTGACCCGGAATCCCTCGACATGGCAGTCT
 AGATCATTCT TGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCATTTTTATAGGTAAATGTGATGATAAATAGTTTCTTAGA
 CGTCAGGTGG CACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG
 CTCATGAGAC AATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCG
 CCTATTCCC TTTTTGCGGCATTTTGCTTCTGTTTGTCTCACCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAG
 ATCAGTTGGG TGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAGAA
 CGTTTTCCAA TGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACT
 CGGTGCGCCG ATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCAAGAAAAGCATCTTACCGATGGCATGA
 CAGTAAGAGA ATTATGAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGA
 CCGAAGGAGC TAACCGCTTTTTTGACAAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGA
 AGCCATACCA AACGACGAGCGTGACACCAGATGCCGTGAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAAC
 TACTTACTCT AGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGAGGACCACTTCTGCGCTCGGCC
 CTTCGGCTG GCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCC
 AGATGGTAAG CCTTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCG
 CTGAGATAGG TGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAA
 CTTTCAATTTT AATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTC
 GTTCCACTGA GCGTCAGACCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCT
 TGCAACAAA AAAACACCGCTACACGCGGTGGTTTGTGTCGGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAC
 GGCTTCAGCA GAGCGCAGATACCAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC
 ACCGCCTACA TACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGCGGATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGG
 ACTCAAGACG ATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAAACGGGGGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGA
 ACGACCTACA CCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGAGAAAGGCGGACAG
 GTATCCGGTA AGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTC
 CTGTGCGGTT TCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAACGCGC
 AGCAACGGAT GCGCCGCTGCGGCTGCTGGAGATGGCGGACGCGATGGATATGTTCTGCCAAGGGTTGGTTTGGCGATTC
 ACAGTTCTCC GCAAGAATTGATTGGCTCCAATTCTTGGAGTGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCGCGCGCTTCCATTAG
 GTCGAGGTGG CCCGGCTCCATGCACCGCAGCGCAACGCGGGGAGGCGACAAAGTATAGGGCGGCGCTACAATCATATGC
 CAACCCGTTT CATGTGCTCGCCGAGGCGGCATAAATCCCGTGACGATCAGCGGTCCAATGATCGAAGTTAGGCTGGTAA
 GAGCCGCGAG CGATCCTTGAAGCTGTCCCTGATGGTCTGTCATCTACCTGCCCTGGACAGCATGGCTGCAACGCGGGCATC
 CCGATGCCGC CGGAAGCGAGAAGAATCATAATGGGGAAGGCCATCCAGCCTCGCGTGGGGAGCTTTTGGCAAGCCTA
 GGCCTCCAAA AAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCGGCTCGGCTCTGCATAAATAAAAAA
 ATTAGTCAGC
 CATG

Fig. 8B

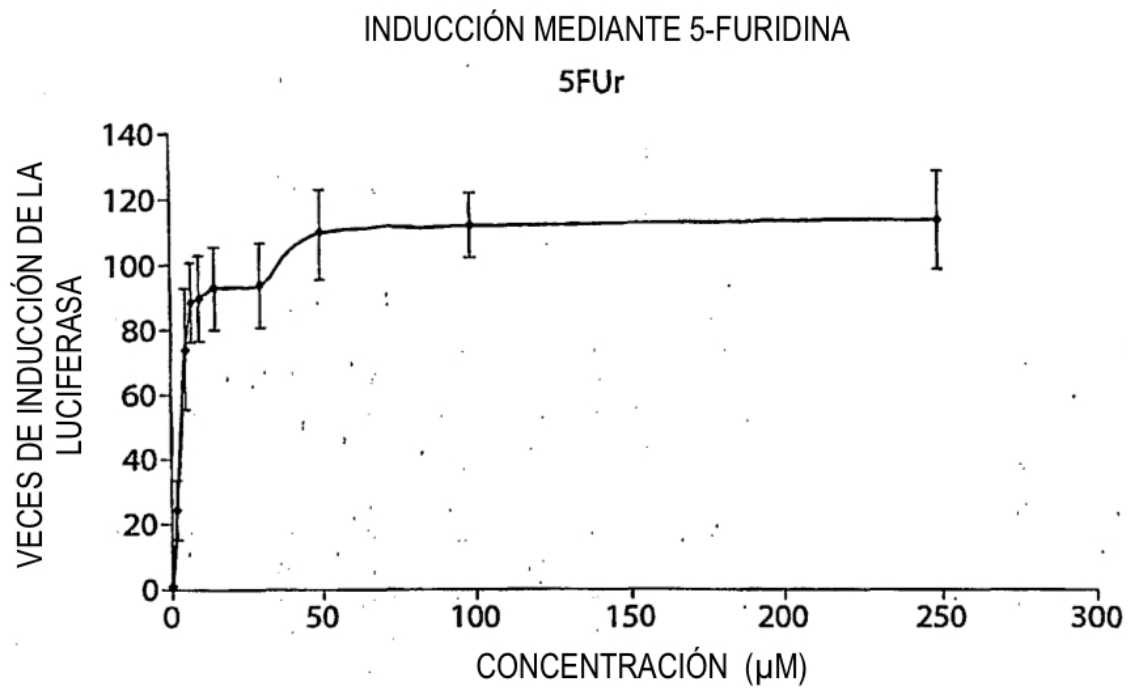


Fig. 9A

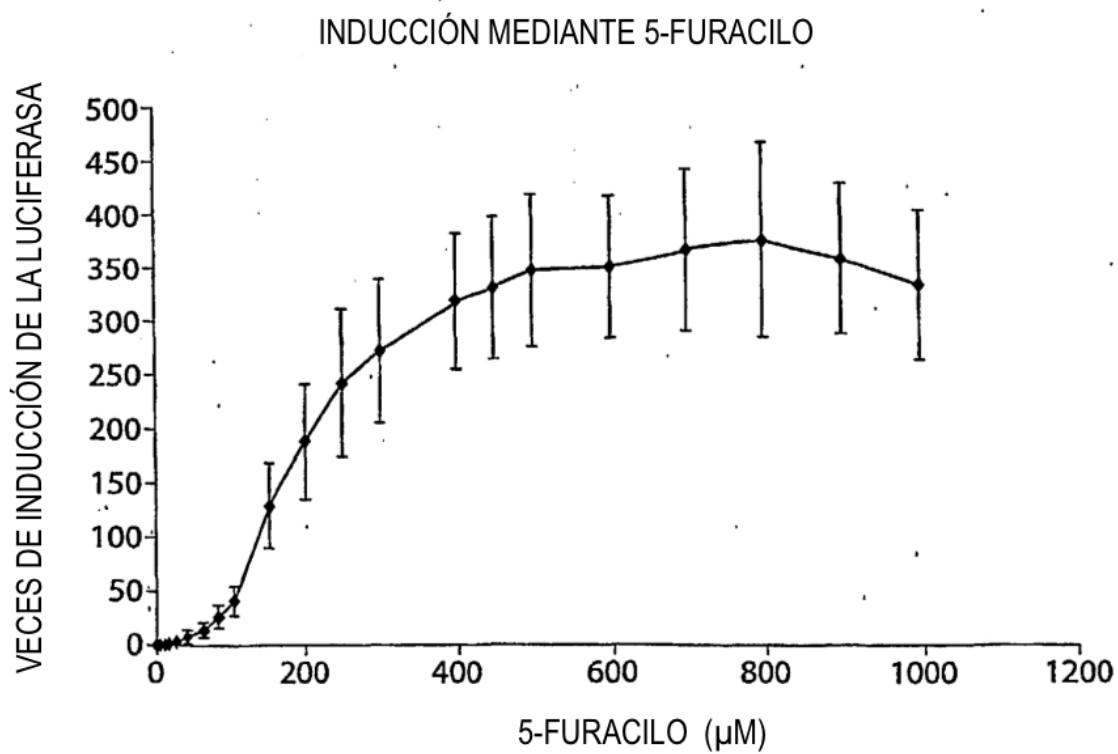


Fig. 9B

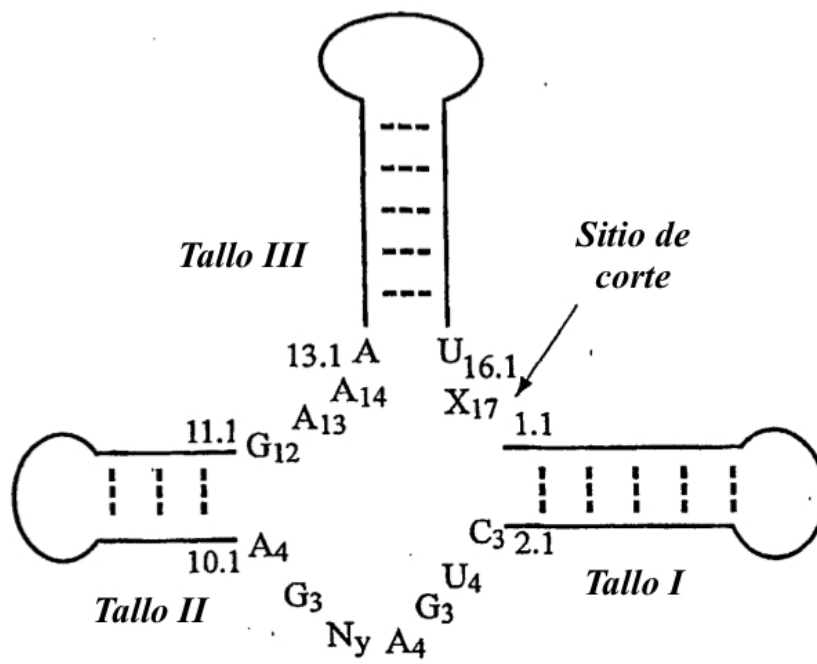


Fig. 10A

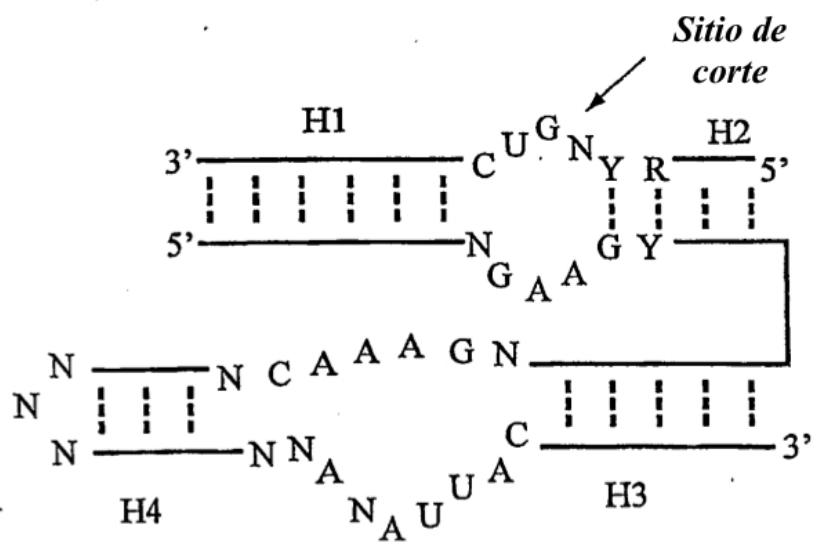


Fig. 10B

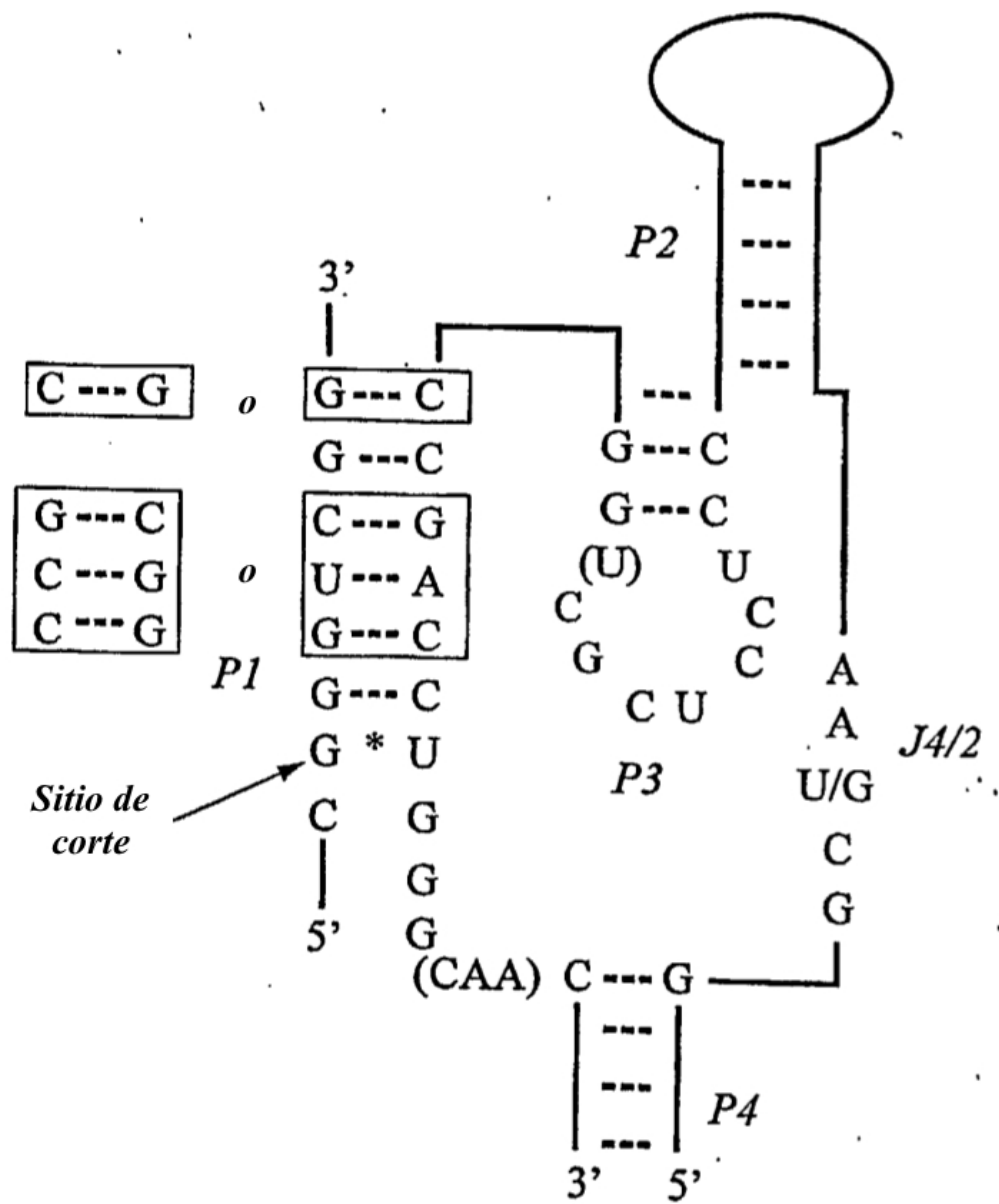


Fig. 10C

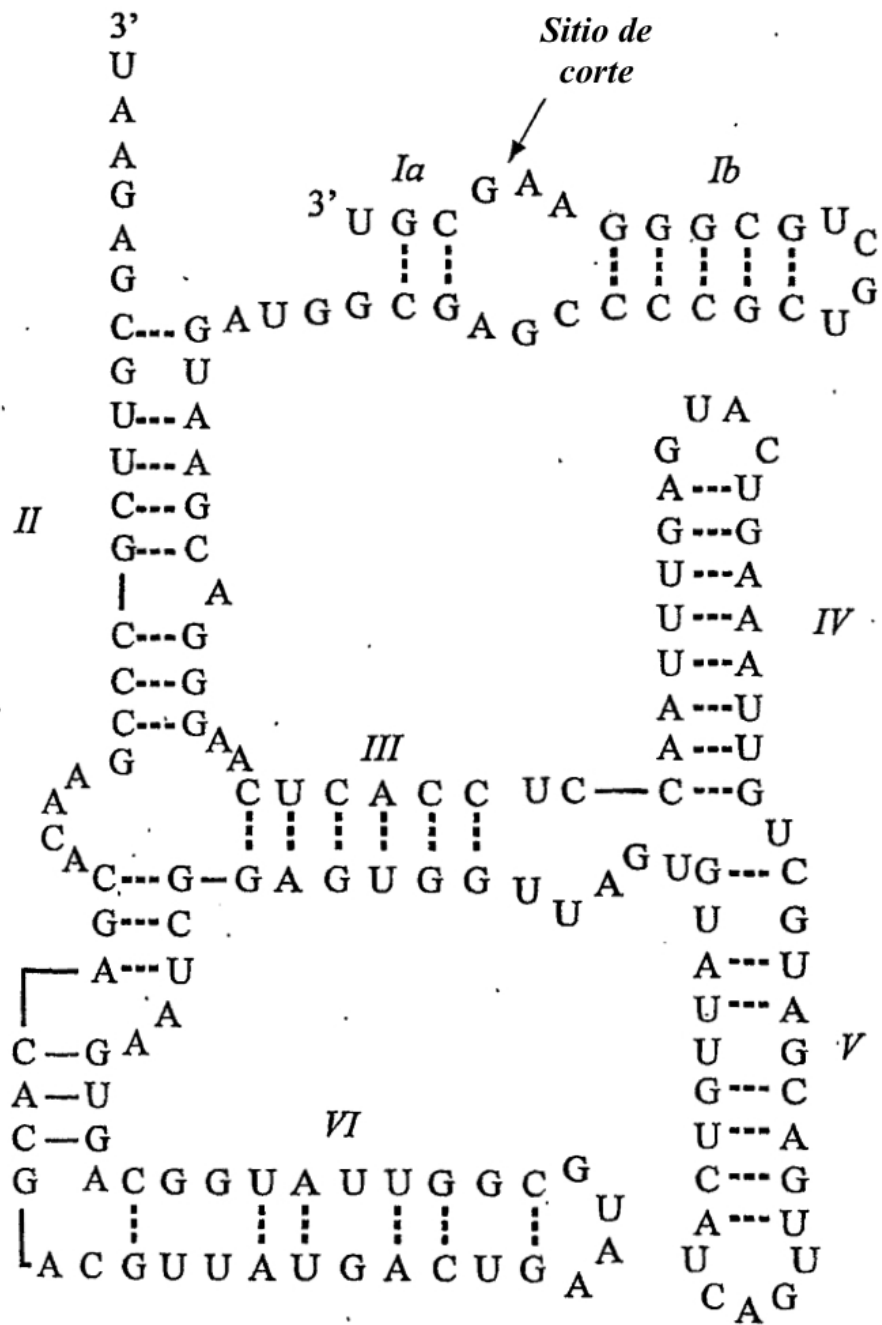


Fig. 10D

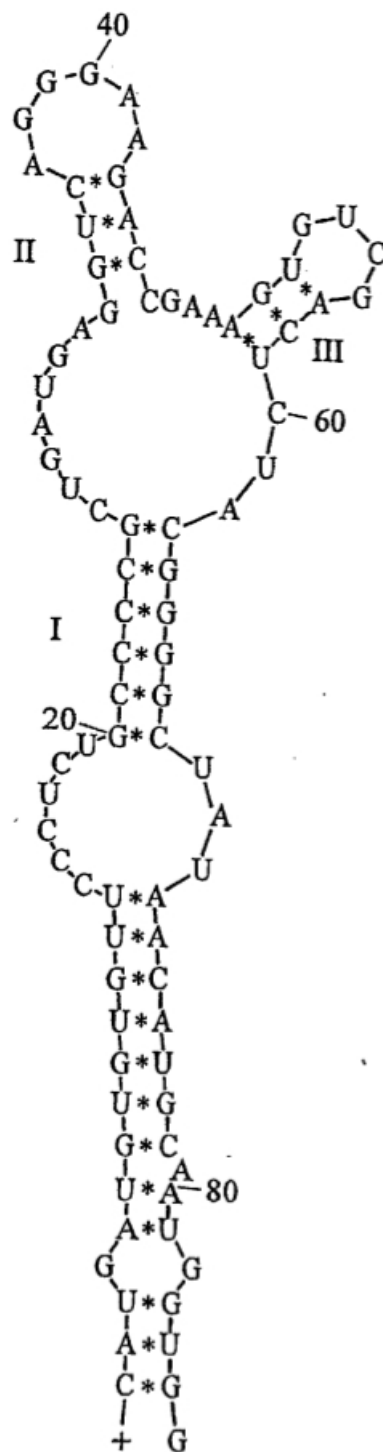


Fig. 11

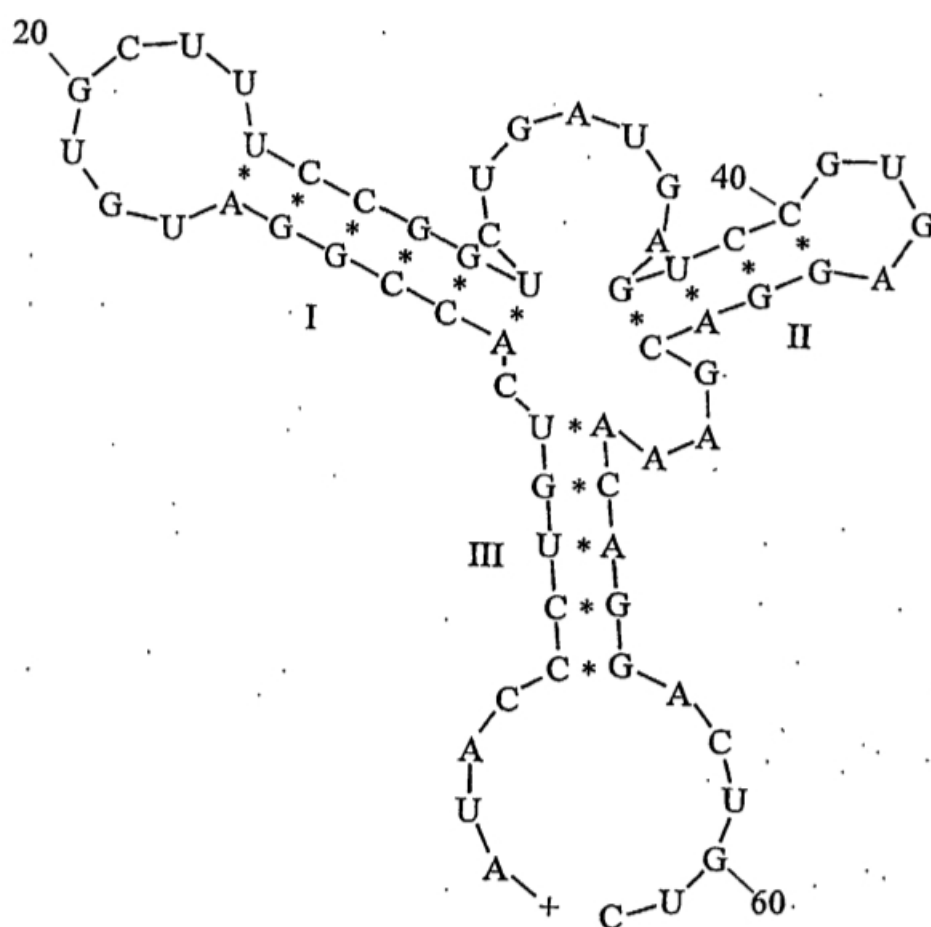


Fig. 12

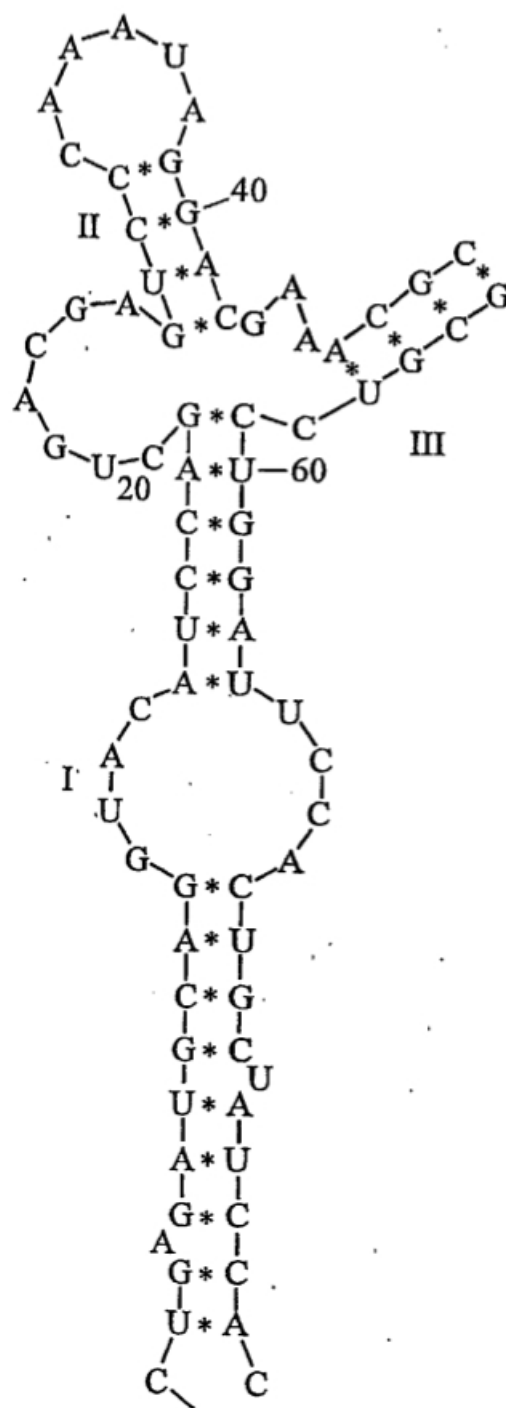


Fig. 13