

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 141**

51 Int. Cl.:

<b>A01N 43/04</b>	(2006.01)
<b>C07H 21/02</b>	(2006.01)
<b>C07H 21/04</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/867</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/11</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2002 PCT/US2002/29215**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2003 WO03022052**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2002 E 02761660 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 1424896**

54 Título: **Método para la expresión de moléculas de ARN pequeño dentro de una célula**

30 Prioridad:

**13.09.2001 US 322031 P**  
**09.01.2002 US 347782 P**  
**18.06.2002 US 389592 P**  
**27.08.2002 US 406436 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.02.2017**

73 Titular/es:

**CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY**  
**(100.0%)**  
**1200 EAST CALIFORNIA BOULEVARD**  
**PASADENA, CALIFORNIA 91125, US**

72 Inventor/es:

**BALTIMORE, DAVID;**  
**QIN, XIAO-FENG y**  
**LOIS-CABALLE, CARLOS**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 601 141 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).

**Método para la expresión de moléculas de ARN pequeño dentro de una célula****Descripción**

5

Antecedentes de la invenciónCampo de la invención

10 La presente invención se refiere generalmente a métodos de alteración de la expresión génica en una célula o un animal usando construcciones virales manipuladas para administrar una molécula de ARN. En un aspecto más específico, se usa una construcción viral para administrar moléculas de ARN bicatenario que pueden usarse para regular por disminución o modular la expresión génica.

15 Descripción de la técnica relacionada

La interferencia por ARN (iARN) o silenciamiento es un fenómeno recientemente descubierto (A. Fire et al., Nature 391, 806 (1998); C.E. Rocheleau et al. Cell 90, 707 (1997)). Los ARN interferentes pequeños ("ARNip") son moléculas de ARN bicatenario que inhiben la expresión de un gen con el que comparten homología. Los ARNip se han usado como herramienta para regular por disminución la expresión de genes específicos en una variedad de células cultivadas, además de en animales vertebrados. Varios de tales enfoques se han revisado recientemente (P.D. Zamore Science 296, 1265 (2002)); sin embargo, tales enfoques tienen limitaciones. Por ejemplo, ninguna técnica antes de la invención descrita en el presente documento permitía la generación de mamífero transgénico que tuviera un gen específico regulado por disminución mediante interferencia por ARN. Similarmente, existe la necesidad de métodos más robustos para la introducción de moléculas de ARN pequeño con función reguladora.

20 Lee NS et al. ("Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells"; Nature Biotechnology, Nature Publishing, USA, Vol. 19, Mayo de 2002, páginas 500-505) se refiere a la expresión de ARNip en células humanas para el silenciamiento génico. En particular, se describe una construcción de administración de plásmido que incluye un promotor U6 de Pol III, un ARNip insertado detrás del promotor Pol III y una señal de terminación de promotor.

30 Miyagishi M et al. ("U6-promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells"; Nature Biotechnology, Nature Publishing, USA, Vol. 19, No. 5, Mayo de 2002, páginas 497-500) desvelan con respecto al silenciamiento génico en células de mamífero un vector de expresión de ARNip que comprende un promotor U6 operativamente unido a una región codificante de ARN para expresar la misma con el fin de silenciar mediante interferencia por ARN genes indicadores o genes endógenos particulares.

40 Paul CP et al. ("Effective expression of small interfering RNA in human cells"; Nature Biotechnology, Nature Publishing, USA, Vol. 20, No. 5, Mayo de 2002, páginas 505-508) se refiere a la expresión de ARN interferente pequeño en células humanas y desvela a este respecto casetes de expresión de U6 clonados en vectores pAV, que se derivan de pCWRSVN.

45 Yu JY et al. ("RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells"; Proceeding of the National Academy of Sciences of USA, National Academy of Science, Washington, USA, Vol. 99, No. 9, Abril de 30, 2002, páginas 6047-6052) se refiere a la expresión de ARN interferentes cortos y ARN de horquilla en células de mamífero que se expresan a partir de un vector de ARN polimerasa III basado en el promotor de ARN de U6 de ratón. Se ha mostrado que estos ARNip inhiben eficazmente la expresión génica en células de mamífero.

50 Ilves et al. ("Retroviral vectors designed for targeted expression of RNA Polymerase III-driven transcripts: a comparative study"; Gene, Vol. 171, 1996, páginas 203-208) desvelan la expresión dirigida de transcritos conducidos por ARN polimerasa III en vectores retrovirales, que tiene una posible aplicación en la expresión estable de ARN cortos terapéuticos o inhibidores. Se sugiere la optimización de sistemas de Pol III / vector retroviral para enfoques terapéuticos. Estas construcciones presentan una LTR de 3' y una LTR de 5'.

La invención proporcionada en el presente documento trata estas y otras limitaciones en el campo de la regulación génica mediada por ARN.

60 Sumario de la invención

La invención se refiere generalmente a métodos de expresión dentro de una célula de una molécula o moléculas de ARN. Estos métodos pueden usarse con una amplia variedad de tipos de células. Las moléculas de ARN pueden expresarse dentro de una célula para una variedad de fines. Por ejemplo, y sin limitación, las moléculas de ARN pueden servir de marcadores dentro de una célula, pueden actuar de oligonucleótidos antisentido o ribozimas para regular la expresión génica, y pueden servir para regular por disminución genes mediante interferencia por ARN.

- 5 En un aspecto, la invención proporciona construcciones retrovirales para la expresión de una molécula o moléculas de ARN dentro de una célula. Las construcciones comprenden preferentemente un ácido nucleico que tiene las secuencias R y U5 de una repetición terminal larga (LTR) lentiviral de 5', una LTR de 3' lentiviral auto-inactivante y un promotor de ARN polimerasa III (pol III). Las construcciones retrovirales comprenden además al menos un transgén que comprende un región codificante de ARN operativamente unida al promotor de ARN polimerasa III. La de región de promotor de ARN polimerasa III y la región codificante de ARN están situadas entre la LTR de 5' y la LTR de 3'.
- 10 La región codificante de ARN va inmediatamente seguida de una secuencia de terminación de Pol III que dirige la terminación precisa y eficaz de la síntesis de ARN por pol III. Las secuencias de terminación de Pol III generalmente comprenden 4 o más restos de T consecutivos. Puede usarse una agrupación de 5 T consecutivas como terminador por la cual la transcripción de Pol III se detiene en la segunda o tercera T del molde de ADN. Como resultado, solo 2 a 3 restos de U se añaden al extremo 3' del ARN que se sintetiza a partir de la región codificante de ARN.
- 15 Puede usarse una variedad de promotores de Pol III con la invención, que incluyen, por ejemplo, los fragmentos de promotor derivados de genes de ARN de H1 o genes de ARNnp de U6 de origen humano o de ratón o de cualquier otra especie. Además, los promotores de Pol III pueden modificarse/manipularse para incorporar otras propiedades deseables tales como para ser inducibles por moléculas químicas pequeñas tanto ubicuamente como en un modo específico de tejido, por ejemplo, uno activado con tetraciclina o IPTG (sistema lacI).
- 20 El promotor de Pol III, región de molde de ARN y terminador de Pol III juntos pueden comprender un "casete de ARN" o "casete de expresión de ARN". Si el ARN es un ARN inhibidor pequeño (ARNip), el casete de expresión puede llamarse un "casete de expresión de ARNip".
- 25 En una realización, la región codificante de ARN codifica una molécula de ARN auto-complementaria que tiene una región sentido, una región antisentido y una región de bucle. Una molécula de ARN tal, cuando se expresa forma deseablemente una estructura de "horquilla". La región de bucle tiene generalmente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 nucleótidos de longitud. La región de bucle puede ser de aproximadamente 6 y aproximadamente 9 nucleótidos de longitud. En una realización de la invención, la región sentido y la región antisentido tienen entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud.
- 30 La región codificante de ARN puede unirse operativamente en la dirección 3' a un promotor de ARN polimerasa III de forma que la secuencia codificante de ARN pueda ser expresada con precisión sin ningún nucleótido no codificante adicional presente en el extremo 5'. De esta forma, puede expresarse una secuencia de ARN que es idéntica a una secuencia diana en el extremo 5'. La síntesis de la región codificante de ARN termina en el sitio de terminador. El sitio de terminador puede consistir en cinco restos T consecutivos.
- 35 En otro aspecto de la invención, el vector retroviral puede comprender múltiples regiones codificantes de ARN. En una realización, la construcción retroviral comprende un primer promotor de ARN Pol III, una primera región codificante que codifica una primera molécula de ARN operativamente unida al primer promotor de ARN Pol III, un segundo promotor de ARN Pol III y una segunda región codificante de ARN operativamente unida al segundo promotor de ARN Pol III. La segunda región codificante de ARN codifica una molécula de ARN que es sustancialmente complementaria a la molécula de ARN codificada por la primera región codificante de ARN, de forma que las dos moléculas de ARN puedan formar una estructura bicatenaria cuando se expresen. También se desvelan múltiples regiones codificantes de ARN que codifican moléculas de ARN auto-complementarias similares a horquilla u otras moléculas no de horquilla.
- 40 En otra realización más de la invención, la construcción retroviral comprende un primer promotor de ARN Pol III operativamente unido a una primera región codificante de ARN, y un segundo promotor de ARN Pol III operativamente unido a la misma primera región codificante de ARN en la dirección opuesta, de forma que la expresión de la región codificante de ARN del primer promotor de ARN Pol III produce una síntesis de una primera molécula de ARN como la hebra codificante y la expresión de la región codificante de ARN del segundo promotor de ARN Pol III produce la síntesis de una segunda molécula de ARN como una hebra no codificante que es sustancialmente complementaria a la primera molécula de ARN. Ambos promotores de la ARN polimerasa III pueden separarse de la región codificante de ARN por secuencias de terminación, preferentemente secuencias de terminación que tienen cinco restos T consecutivos.
- 45 En otra realización de la invención, las secuencias de LTR de 5' en la construcción retroviral se derivan del VIH. La construcción retroviral también puede comprender una secuencia de elemento potenciador del virus de la hepatitis de la marmota y/o una secuencia de supresor de ámbar de ARNt.
- 50 En otra realización de la invención, la LTR de 3' auto-inactivante comprende un elemento U3 con una delección de su secuencia de potenciador. En otra realización más, la LTR de 3' auto-inactivante es una LTR de 3' del VIH modificada.
- 55
- 60
- 65

La construcción retroviral recombinante puede pseudotipificarse, por ejemplo, con la glucoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular.

5 En otro aspecto de la invención, la expresión de la región codificante de ARN produce la regulación por disminución de un gen diana. Preferentemente, el gen diana comprende una secuencia que es al menos aproximadamente el 90 % idéntica a la región codificante de ARN, más preferentemente al menos aproximadamente el 95 % idéntica, e incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 99 % idéntica.

10 La construcción viral también puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un gen de interés. El gen de interés está preferentemente operativamente unido a un promotor de la polimerasa II. Una construcción tal también puede contener, por ejemplo, una secuencia de potenciador operativamente unida al promotor de la polimerasa II.

15 Puede usarse una variedad de promotores de la polimerasa II con la invención, que incluyen, por ejemplo, un promotor del CMV. El promotor de la ARN polimerasa II que se elige puede ser un promotor ubicuo, capaz de conducir la expresión en la mayoría de los tejidos, por ejemplo, el promotor humano de la ubiquitina-C, promotor de  $\beta$ -actina del CMV o promotor de PGK. En otras realizaciones, el promotor de la ARN polimerasa II es un promotor específico de tejido.

20 En una realización, el gen de interés es un gen marcador o indicador, que puede usarse para verificar que el vector se transfirió o transdujo satisfactoriamente y se expresaron sus secuencias. En una realización tal, el gen de interés es un gen indicador fluorescente, por ejemplo, la proteína verde fluorescente. El gen de interés también puede ser un gen resistente a fármaco que puede usarse para seleccionar las células que son satisfactoriamente transducidas. Por ejemplo, el gen resistente a fármaco puede ser el gen resistente a zeocina (zeo). El gen de interés también  
25 puede ser un híbrido de un gen resistente a fármaco y un gen indicador fluorescente, tal como una fusión zeo/gfp. El gen de interés puede codificar un factor de proteína que puede regular la actividad de transcripción de promotores de Pol III inducibles. En tal caso, el gen de interés es tetR (represor para el operón tet) que regula promotores de Pol III sensibles a tetraciclina.

30 Es otro aspecto de la invención proporcionar métodos de expresión de una molécula o moléculas de ARN dentro de una célula. Según la invención, una línea celular de encapsidación se transfecta con una construcción retroviral de la invención, se recuperan partículas retrovirales recombinantes de la línea celular de encapsidación; y se infecta una célula diana *in vitro* con las partículas de retrovirus recombinantes.

35 En una realización de la invención, la célula diana es una célula embrionaria no humana. Una célula embrionaria no humana puede ser, por ejemplo, un embrión unicelular o células embrionarias de dentro de un embrión de fase temprana. La célula diana puede ser una célula madre embriogénica no humana. Cuando la célula diana es una célula embrionaria no humana, en una realización, dicha célula embrionaria se infecta inyectando el retrovirus recombinante entre la zona pelúcida y la membrana celular de la célula embrionaria no humana. En otra realización,  
40 la célula embrionaria no humana se infecta eliminando la zona pelúcida e incubando la célula en disolución que contiene el retrovirus recombinante. En una realización tal, la zona pelúcida puede eliminarse, por ejemplo, por digestión enzimática.

45 Cuando la célula diana es una célula embrionaria no humana o una célula madre embriogénica no humana, la célula puede trasplantarse en una hembra pseudo-preñada para generar un animal transgénico.

Los métodos de la invención también pueden usarse con una variedad de células normales o enfermas *ex vivo* primarias o células adaptadas en diversas condiciones de cultivo de tejido de humano, ratón y otros vertebrados, que incluyen, sin limitación, células madre o precursoras para el sistema hematopoyético, células del sistema  
50 nervioso central, células con capacidades regenerativas de una variedad de otros tejidos y órganos, células dendríticas y otras células mieloides y linfoides en desarrollo y maduras, y células cancerosas derivadas de diferentes linajes celulares.

55 En una realización particular, la célula diana es una célula embrionaria de un ave. La célula embrionaria de un ave se infecta preferentemente poniendo en contacto el blastodisco embrionario del huevo del ave con partículas retrovirales.

60 En otra realización más, la célula diana es un huevo de pez. El huevo de pez se infecta preferentemente por administración de las partículas retrovirales al espacio entre el corión y la membrana celular del huevo de pez.

### **Breve descripción de los dibujos**

65 La Figura 1A muestra un diagrama esquemático de un vector retroviral que lleva un casete de expresión para la expresión de ARN, llamado "casete de ARN" y un "gen marcador" o gen de interés. El casete de expresión de ARN puede incorporarse en cualquier sitio permisible de la construcción retroviral tanto como copia única como múltiples copias en tándem. Además, aunque no se indica en la figura, más de un casete de expresión de ARN puede estar

presente en la construcción retroviral. La Figura 1B muestra una construcción similar en la que los casetes de expresión de ARN flanquean un gen marcador.

La Figura 2 muestra una vista esquemática de un casete de expresión de ARN que comprende un promotor de ARN polimerasa III **100** unido a una región codificante de ARN **110-130** y una secuencia de terminación **140**. La región codificante de ARN comprende una región sentido **110**, una región de bucle **120** y una región antisentido **130**.

La Figura 3 muestra una vista esquemática de un casete de expresión de ARN que tiene un promotor de ARN polimerasa III **100** unido a una primera región codificante de ARN **110** y una primera secuencia de terminación **140** y un segundo promotor de ARN polimerasa III **105** unido a una segunda región codificante de ARN **115** y un segundo terminador **145**.

La Figura 4 muestra una vista esquemática de un casete de expresión de ARN que tiene un primer promotor de ARN polimerasa III **100** unido a una región codificante de ARN **110** y una primera secuencia de terminación **145**. El casete de expresión tiene un segundo promotor de ARN polimerasa III **105** unido a la región codificante de ARN **115**, la misma secuencia que **110** en inversa, y un segundo terminador **140**.

Figura 5. Ilustración esquemática de un vector lentiviral que codifica ARNip de lacZ. Se muestra una secuencia conectora de 7 pares de bases para garantizar la transcripción de iniciación precisa, seguido de una pequeña región codificante de ARN de horquilla que comprende una secuencia de 19 nt correspondiente a la región 1900-1918 de la hebra codificante de la secuencia codificante del gen beta-galactosidasa (lacZ) bacteriano y la secuencia complementaria inversa perfecta de 19 nt separada por una región de bucle de 9 nt. El terminador comprendió 5 restos de timidina consecutivos.

Figura 6. Un ARNip específico de lacZ codificado por un vector lentiviral puede inhibir eficazmente la expresión del gen indicador lacZ en células de mamífero transducidas en virus. MEF: fibroblastos embrionarios de ratón; HEK293: células renales embrionarias humanas. Ambas de las líneas celulares de prueba alojan genes indicadores lacZ y de luciferasa de luciérnaga, y los niveles de expresión de los genes indicadores pueden medirse por ensayos quimioluminiscentes. Ctrl: la relación de la actividad de lacZ frente a la actividad de Luc de las células parentales sin infectar, que se estableció arbitrariamente a 1. Transducida: la inhibición específica de la expresión de lacZ calculada como la reducción de la relación de lacZ con respecto a Luc.

Figura 7. Animales transgénicos que expresan una molécula de ARNip específica de lacZ codificada por un vector lentiviral pueden suprimir satisfactoriamente la expresión del gen indicador lacZ ubicuo en una referencia de ROSA26+/- . ROSA1-6: las actividades de lacZ en los tejidos de las extremidades de seis embriones E17.5 ROSA26+/- que sirvieron de controles positivos. La diferencia en la actividad de lacZ entre embriones ROSA26+/- individuales puede resultar de eficiencia de extracción de proteína variable. TG1-4: las actividades de lacZ en los tejidos de las extremidades de cuatro embriones transgénicos E17.5 que expresan una molécula de ARNip de lacZ codificada por vector lentiviral en referencia de ROSA+/- . WT1-6: actividad de lacZ en los tejidos de las extremidades de seis embriones no mutantes E17.5 C57B1/6, incluidos como el control negativo. Los niveles de referencia de la actividad de beta-galactosidasa endógena están en general por debajo de 1.000 UL/μg, así las columnas no son visibles.

La Figura 8 muestra una ilustración esquemática de un vector lentiviral de ARNip de lacZ inducible por Tet. Un gen represor Tet (TetR; SEQ ID NO: 5) está bajo el control del promotor de ubiquitina C humana y su expresión puede monitorizarse por el marcador GFP en la dirección 3' acoplado por el elemento IRES (sitio interno de entrada al ribosoma). El casete de ARNip anti-lacZ es conducido por un promotor de Pol III inducible por Tet derivado del promotor U6 humano (-328 a +1) que contiene un único sitio de unión a TetR (TetO1) entre la caja PSE y TATA (SEQ ID NO: 4). En ausencia de tetraciclina, TetR se une a un promotor y su expresión es reprimida. Tras la adición de tetraciclina, TetR se mueve desde el promotor e inicia la transcripción.

La Figura 9 muestra los resultados de un experimento que demostró que un casete de expresión de ARNip inducible por Tet puede regular la expresión génica en respuesta a tratamiento con doxiciclina. Se transdujeron células HEK293 que expresan lacZ y luciferasa doble (293Z+Luc) con un vector lentiviral que lleva un casete de ARNip de lacZ inducible por Tet y un represor Tet bajo el control de un promotor de ubiquitina C (Figura 8). Las células transducidas se trataron con 10 μg/ml de doxiciclina (Más Dox) durante 48 h o sin el tratamiento de doxiciclina como control (Sin Dox). Se midieron las actividades de lacZ y luciferasa como se describe en las figuras previas. La actividad de supresión relativa se calcula como la relación de lacZ frente a luciferasa y el control Sin Dox se estableció arbitrariamente a 1.

### **Descripción detallada**

Los inventores han identificado previamente un método de introducción de un transgén de interés en una célula o animal. Esta técnica se describe en la solicitud de patente provisional de EE.UU. en tramitación junto con la presente número 60/322.031 presentada el 13/09/2001 y la solicitud de patente provisional de EE.UU. en tramitación junto con la presente número 60/347.782 presentada el 09/01/2002.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento puede usarse en la práctica de la presente invención.

Por "transgén" se indica cualquier secuencia de nucleótidos, particularmente una secuencia de ADN, que se integra en uno o más cromosomas de una célula huésped por intervención humana, tal como por los métodos de la presente invención. Un transgén puede ser una "región codificante de ARN". El transgén puede comprender un "gen de interés." El transgén también puede ser una secuencia de nucleótidos, preferentemente una secuencia de ADN, que se usa para marcar el cromosoma donde se ha integrado. En esta situación, el transgén no tiene que comprender un gen que codifica una proteína que puede expresarse.

Un "gen de interés" es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína u otra molécula que se desea para la integración en una célula huésped. El gen de interés puede codificar una proteína u otra molécula cuya expresión se desea en la célula huésped. En tal caso, el gen de interés está generalmente operativamente unido a otras secuencias que son útiles para obtener la expresión deseada del gen de interés, tales como secuencias reguladoras transcripcionales.

Una "relación funcional" y "operativamente unida" significan, sin limitación, que el gen está en la localización y orientación correctas con respecto a un promotor y/o potenciador cuya expresión del gen se afectará cuando un promotor y/o potenciador se ponga en contacto con las moléculas apropiadas.

Una "región codificante de ARN" es un ácido nucleico que puede servir de molde para la síntesis de una molécula de ARN, tal como un ARNip. Preferentemente, la región codificante de ARN es una secuencia de ADN.

Un "ARN interferente pequeño" o "ARNip" es una molécula de ARN bicatenario que es capaz de inhibir la expresión de un gen con el que comparte homología. El ARNip puede ser una "horquilla" o molécula de ARN de tallo-bucle, que comprende una región sentido, una región de bucle y una región antisentido complementaria a la región sentido. El ARNip puede comprender dos moléculas de ARN distintas que se asocian no covalentemente para formar un dúplex.

El término "transgénico" se usa en el presente documento para describir la propiedad de alojar un transgén. Por ejemplo, un "organismo transgénico" es cualquier animal, que incluye mamíferos, peces, aves y anfibios, en el que una o más de las células del animal contienen ácido nucleico introducido mediante intervención humana, tal como por los métodos descritos en el presente documento. En un animal transgénico que comprende un transgén que codifica un gen de interés, el transgén normalmente produce la célula para expresar o expresar en exceso una proteína recombinante. Sin embargo, según los métodos de la invención, la expresión de una región codificante de ARN puede usarse para regular por disminución la expresión de un gen particular mediante mecanismos de interferencia antisentido o por ARN.

Los términos "fundador", "animal fundador" y "línea fundadora" se refieren a aquellos animales que son productos maduros de los embriones u ovocitos a los que se añadió el transgén, es decir, aquellos animales que crecieron a partir de los embriones u ovocitos en los que se insertó ADN.

Los términos "progenie" y "progenie del animal transgénico" se refieren a toda y cada una de la descendencia de cada generación posterior al animal originalmente transformado.

El término "animal" se usa en su sentido más amplio y se refiere a todos los animales que incluyen mamíferos, aves, peces, reptiles y anfibios.

El término "mamífero" se refiere a todos los miembros de la clase Mammalia e incluye cualquier animal clasificado como mamífero, que incluye seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para deportes o mascotas, tales como ratón, conejo, cerdo, oveja, cabra, ganado vacuno y primates superiores.

El término "ovocito" se refiere a una célula de gameto femenina e incluye ovocitos primarios, ovocitos secundarios y óvulo sin fecundar maduro. Como se usa en el presente documento, el término "huevo" cuando se usa en referencia a un huevo de mamífero significa un ovocito rodeado por una zona pelúcida. El término "cigoto" se refiere a un óvulo fecundado. El término "embrión" se refiere ampliamente a un animal en las fases tempranas de desarrollo.

"Espacio perivitelino" se refiere al espacio localizado entre la zona pelúcida y la membrana celular de un huevo de mamífero o célula embrionaria.

"Célula diana" o "célula huésped" significa una célula que va a transformarse usando los métodos y composiciones de la invención.

"Lentivirus" se refiere a un género de retrovirus que es capaz de infectar células en división y no en división. Varios ejemplos de lentivirus incluyen VIH (virus de la inmunodeficiencia humana; que incluye VIH tipo 1 y VIH tipo 2), el agente etiológico del síndrome de la inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA); Maedi-Visna, que produce encefalitis (Visna) o neumonía (Maedi) en ovejas, el virus de la artritis-encefalitis caprina, que produce inmunodeficiencia, artritis y encefalopatía en cabras; virus de la anemia infecciosa equina, que produce anemia hemolítica autoinmunitaria y encefalopatía en caballos; virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), que produce inmunodeficiencia en gatos; virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB), que produce linfadenopatía, linfocitosis y posiblemente infección del sistema nervioso central en ganado vacuno; y virus de la inmunodeficiencia simia (VIS), que produce inmunodeficiencia y encefalopatía en primates sub-humanos.

Un genoma lentiviral está generalmente organizado en una repetición terminal larga (LTR) de 5', el gen *gag*, el gen *pol*, el gen *env*, los genes accesorios (*nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*) y una LTR de 3'. La LTR viral se divide en tres regiones llamadas U3, R y U5. La región U3 contiene los elementos potenciador y promotor. La región U5 contiene las señales de poliadenilación. La región R (repetición) separa las regiones U3 y U5 y las secuencias transcritas de la región R aparecen en tanto los extremos 5' como 3' del ARN viral. Véanse, por ejemplo, "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000)), O Narayan and Clements J. Gen. Virology 70:1617-1639 (1989), Fields et al. Fundamental Virology Raven Press. (1990), Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. J Virol. 72(10):8150-7 (1998), y la patente de EE.UU. N.º 6.013.516.

Se conocen en la técnica vectores lentivirales, que incluyen varios que se han usado para transfectar células madre hematopoyéticas. Tales vectores pueden encontrarse, por ejemplo, en las siguientes publicaciones: Evans JT et al. Hum Gene Ther 1999;10:1479-1489; Case SS, Price MA, Jordan CT et al. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:2988-2993; Uchida N, Sutton RE, Frier AM et al. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:11939-11944; Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE et al. Science 1999;283:682-686; Sutton RE, Wu HT, Rigg R et al. Human immunodeficiency virus type 1 vectors efficiently transduce human hematopoietic stem cells. J Virol 1998;72:5781-5788.

"Virión", "partícula viral" y "partícula retroviral" se usan en el presente documento para referirse a un único virus que comprende un genoma de ARN, proteínas derivadas del gen *pol*, proteínas derivadas del gen *gag* y una bicapa de lípido que presenta una (gluco)proteína de la envuelta. El genoma de ARN es normalmente un genoma de ARN recombinante y así puede contener una secuencia de ARN que es exógena al genoma viral nativo. El genoma de ARN también puede comprender una secuencia viral endógena defectuosa.

Un retrovirus "pseudotipificado" es una partícula retroviral que tiene una proteína de la envuelta que es de un virus distinto del virus del que se deriva el genoma de ARN. La proteína de la envuelta puede ser de un retrovirus diferente o de un virus no retroviral. Una proteína de la envuelta preferida es la proteína del virus G de la estomatitis vesicular (VSV G). Sin embargo, para eliminar la posibilidad de infección humana, los virus pueden ser alternativamente pseudotipificados con proteína de la envuelta ecotrópica que limitan la infección a una especie específica, tales como ratones o aves. Por ejemplo, puede usarse una proteína de la envuelta ecotrópica mutante, tal como la proteína de la envuelta ecotrópica 4.17 (Powell et al. Nature Biotechnology 18(12): 1279-1282 (2000)).

El término "provirus" se usa para referirse a una secuencia de ADN de dúplex presente en un cromosoma eucariota que se corresponde con el genoma de un retrovirus de ARN. El provirus pueden transmitirse de una generación de células a la siguiente sin causar lisis o destrucción de la célula huésped.

Una "LTR de 3' auto-inactivante" es una repetición terminal larga (LTR) de 3' que contiene una mutación, sustitución o delección que previene que las secuencias de LTR conduzcan la expresión de un gen en la dirección 3'. Una copia de la región U3 de la LTR de 3' actúa de molde para la generación de ambas LTR en el provirus integrado. Así, cuando la LTR de 3' con una delección o mutación inactivante se integra como la LTR de 5' del provirus, no es posible transcripción de la LTR de 5'. Esto elimina la competencia entre el potenciador/promotor viral y cualquier potenciador/promotor interno. LTR de 3' auto-inactivantes se describen, por ejemplo, en Zufferey et al. J Virol. 72:9873-9880 (1998), Miyoshi et al. J Virol. 72:8150-8157 e Iwakuma et al. Virology 261:120-132 (1999).

El término "interferencia por ARN o silenciamiento" se define ampliamente e incluye todos los mecanismos post-transcripcionales y transcripcionales de la inhibición mediada por ARN de la expresión génica, tales como aquellos descritos en (P.D. Zamore Science 296, 1265 (2002)).

En un aspecto de la invención, se usa un retrovirus recombinante para administrar un transgén que comprende una región codificante de ARN de interés a una célula diana. Preferentemente, la célula diana es una célula de mamífero. La célula puede ser una célula primaria, o puede ser una célula cultivada, por ejemplo y sin limitación, una célula HEK, CRO, COS, MEF, 293. La célula diana puede ser un ovocito o una célula embrionaria no humana, más preferentemente un embrión unicelular no humano. La región codificante de ARN y cualquier elemento genético asociado se integran así en el genoma de la célula diana como un provirus. Cuando la célula diana es un embrión no humano, puede entonces permitirse que la célula se desarrolle en un animal no humano transgénico por métodos muy conocidos en la técnica.

El retrovirus recombinante usado para administrar la región codificante de ARN es preferentemente un lentivirus

modificado, y así es capaz de infectar tanto células en división como no en división. El retrovirus recombinante comprende preferentemente un genoma lentiviral modificado que incluye el transgén. Además, el genoma lentiviral modificado carece preferentemente de genes endógenos para las proteínas requeridas para la replicación viral, previniendo así la replicación no deseada, tal como la replicación en un animal no humano transgénico resultante. Las proteínas requeridas se proporcionan preferentemente en *trans* en la línea celular de encapsidación durante la producción del retrovirus recombinante, como se describe más adelante.

El retrovirus recombinante usado para administrar la región codificante de ARN puede ser un virus de Moloney modificado, por ejemplo, un virus de la leucemia murina de Moloney. El virus también pueden ser un virus de células madre murinas (Hawley, R. G., et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10297-10302; Keller, G., et al. (1998) Blood 92:877-887; Hawley, R. G., et al. (1994) Gene Ther. 1:136-138). El retrovirus recombinante también puede ser un virus híbrido tal como aquel descrito en Choi, JK; Hoanga, N; Vilardi, AM; Conrad, P; Emerson, SG; Gewirtz, AM. (2001) Hybrid HIV/MSCV LTR Enhances Transgene Expression of Lentiviral Vectors in Human CD34+ Hematopoietic Cells. Stem Cells 19, No. 3, 236-246.

El transgén se incorpora en una construcción viral que comprende una LTR de 5' retroviral intacta y una LTR de 3' auto-inactivante. La construcción viral se introduce en una línea celular de encapsidación que encapsida el ARN genómico viral basado en la construcción viral en partículas virales con la especificidad por huésped deseada. Las partículas virales se recogen y se usan para infectar la célula huésped. Cada uno de estos aspectos se describe en detalle más adelante.

#### La construcción viral

La construcción viral es una secuencia de nucleótidos que comprende secuencias necesarias para la producción de retrovirus recombinante en una célula de encapsidación. La construcción viral puede comprender adicionalmente elementos genéticos que permiten la expresión deseada de una molécula de ARN o gen de interés en el huésped.

La generación de la construcción viral puede llevarse a cabo usando cualquier técnica de ingeniería genética adecuada muy conocida en la técnica, que incluye, sin limitación, las técnicas convencionales de PCR, síntesis de oligonucleótidos, digestión con endonucleasa de restricción, ligación, transformación, purificación de plásmidos y secuenciación de ADN, por ejemplo, como se describen en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989)), Coffin et al. (Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1997)) y "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000)).

La construcción viral pueden incorporar secuencias del genoma de cualquier organismo conocido. Las secuencias pueden incorporarse en su forma nativa o pueden modificarse de cualquier forma. Por ejemplo, las secuencias pueden comprender inserciones, deleciones o sustituciones. La construcción viral comprende secuencias de un genoma de lentivirus, tal como el genoma del VIH o el genoma del VIS.

La construcción viral comprende secuencias de las LTR de 5' y 3' de un lentivirus. En particular, la construcción viral comprende las secuencias R y U5 de la LTR de 5' de un lentivirus y una LTR de 3' auto-inactivante de un lentivirus. Las secuencias de LTR pueden ser las secuencias de LTR de cualquier lentivirus de cualquier especie. Por ejemplo, pueden ser secuencias de LTR de VIH, VIS, VIF o VIB. Preferentemente, las secuencias de LTR son secuencias de LTR del VIH. El virus también pueden incorporar secuencias de MMV o MSCV.

La construcción viral comprende una LTR de 3' auto-inactivante. El elemento U3 de la LTR de 3' puede contener una deleción de su secuencia de potenciador, preferentemente la caja TATA, sitios Sp1 y NF-kappa B. Como resultado de la LTR de 3' auto-inactivante, el provirus que se integra en el genoma de la célula huésped comprenderá una LTR de 5' inactivada.

Opcionalmente, la secuencia U3 de la LTR de 5' lentiviral puede sustituirse con una secuencia promotora en la construcción viral. Esto puede aumentar el título de virus recuperado de la línea celular de encapsidación. También puede incluirse una secuencia de potenciador. Puede usarse cualquier combinación de potenciador/promotor que aumente la expresión del genoma de ARN viral en la línea celular de encapsidación. En la realización preferida se usa la secuencia de potenciador/promotora del CMV (patente de EE.UU. N.º 5.168.062; Karasuyama et al J. Exp. Med. 169:13 (1989)).

La construcción viral también comprende un transgén. El transgén puede ser cualquier secuencia de nucleótidos, que incluye secuencias que sirven de marcadores para el provirus. Preferentemente, el transgén comprende una o más regiones codificantes de ARN y/o uno o más genes de interés. Diagramas esquemáticos de construcciones retrovirales a modo de ejemplo se muestran en las Figuras 1A y 1B.

Según la presente invención, el transgén comprende al menos una región codificante de ARN. Preferentemente, la región codificante de ARN es una secuencia de ADN que puede servir de molde para la expresión de una molécula de ARN deseada en la célula huésped. En una realización, la construcción viral comprende dos o más regiones

codificantes de ARN.

Según la presente invención, la construcción viral también comprende al menos un promotor de ARN polimerasa III. El promotor de ARN polimerasa III está operativamente unido a la región codificante de ARN y también puede unirse a una secuencia de terminación. Además, puede incorporarse más de un promotor de ARN polimerasa III.

Los promotores de ARN polimerasa III son muy conocidos para un experto en la materia. Puede encontrarse una variedad adecuada de promotores de ARN polimerasa III, por ejemplo, en Paule y White, *Nucleic Acids Research*, Vol 28, pp 1283-1298 (2000). La definición de promotores de ARN polimerasa III también incluye cualquier fragmento de ADN sintético o manipulado que pueda dirigir la ARN polimerasa III para transcribir una secuencia codificante de ARN en la dirección 3'. Además, el promotor o promotores de ARN polimerasa III (Pol III) usados como parte del vector viral pueden ser inducibles. Puede usarse cualquier promotor de Pol III inducible adecuado con los métodos de la invención. Promotores de Pol III particularmente adecuados incluyen los promotores sensibles a la tetraciclina proporcionados en Ohkawa and Taira *Human Gene Therapy*, Vol. 11, pp 577-585 (2000) y en Meissner et al. *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, pp 1672-1682 (2001).

El transgén puede comprender un gen de interés que codifica una proteína que se expresa deseablemente en una o más células de un animal no humano transgénico, por ejemplo, una proteína indicadora o marcadora. Preferentemente, el gen de interés está situado entre las secuencias de LTR de 5' y de LTR de 3'. Además, el gen de interés está preferentemente en una relación funcional con otros elementos genéticos, por ejemplo, secuencias reguladoras de la transcripción tales como promotores y/o potenciadores, para regular la expresión del gen de interés de una manera particular una vez el transgén se incorpora en el genoma del huésped. Secuencias reguladoras transcripcionales útiles pueden ser aquellas que son altamente reguladas con respecto a la actividad, tanto temporalmente como espacialmente.

Preferentemente, el gen de interés está en una relación funcional con las secuencias reguladoras del promotor/potenciador interno de la polimerasa II. Un promotor/potenciador "interno" es uno que está situado entre las secuencias de LTR de 5' y de LTR de 3' en la construcción viral y está operativamente unido al gen que es deseablemente expresado.

El promotor/potenciador de la polimerasa II puede ser cualquier promotor, potenciador o combinación de promotor/potenciador conocida por aumentar la expresión de un gen con el que está en una relación funcional.

El promotor/potenciador interno se selecciona preferentemente basándose en el patrón de expresión deseado del gen de interés y las propiedades específicas de promotores/potenciadores conocidos. Así, el promotor interno puede ser un promotor constitutivo. Ejemplos no limitantes de promotores constitutivos que pueden usarse incluyen un promotor para ubiquitina, CMV (patente de EE.UU. N.º 5.168.062; Karasuyama et al *J. Exp. Med.* 169:13 (1989),  $\beta$ -actina (Gunning et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4831-4835 (1987) y pgk (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 4.615.974 y 5.104.795; Adra et al. *Gene* 60:65-74 (1987), Singer-Sam et al. *Gene* 32:409-417 (1984) y Dobson et al. *Nucleic Acids Res.* 10:2635-2637 (1982)). Alternativamente, un promotor puede ser un promotor específico de tejido. Varios ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido que pueden usarse incluyen lck (véase, por ejemplo, Garvin et al. *Mol. Cell Biol.* 8:3058-3064 (1988) y Takadera et al. *Mol. Cell Biol.* 9:2173-2180 (1989)), miogenina (Yee et al. *Genes and Development* 7:1277-1289 (1993) y thyl (Gundersen et al. *Gene* 113:207-214 (1992)). Además, pueden seleccionarse promotores para permitir la expresión inducible del transgén. Se conocen en la técnica varios sistemas de expresión inducible usando un promotor tal, que incluyen el sistema sensible a tetraciclina y el sistema de operador-represor *lac*. También se contempla que pueda usarse una combinación de promotores para obtener la expresión deseada del gen de interés. El experto será capaz de seleccionar un promotor basándose en el patrón de expresión deseado del gen en el animal no humano transgénico resultante.

También puede estar presente un potenciador interno en la construcción viral para aumentar la expresión del gen de interés. Por ejemplo, puede usarse el potenciador del CMV (Karasuyama et al *J. Exp. Med.* 169:13 (1989) en combinación con el promotor de  $\beta$ -actina de pollo (véase, por ejemplo, el documento JP 1990005890-A1). Nuevamente, un experto en la materia será capaz de seleccionar el potenciador apropiado basándose en el patrón de expresión deseado.

El gen de interés no está limitado de ningún modo e incluye cualquier gen que el profesional habitual desee tener integrado y/o expresado en un animal no humano transgénico. Por ejemplo, el gen de interés puede ser uno que codifica una proteína que sirve de marcador para identificar células que comprenden al provirus. El gen de interés puede codificar una proteína que modifica una característica física del animal no humano transgénico, tal como una proteína que modifica el tamaño, crecimiento o composición de tejido. En otro ejemplo, el gen de interés puede codificar una proteína de valor comercial que puede recogerse del animal no humano transgénico.

Además, más de un gen de interés puede ponerse en relación funcional con el promotor interno. Por ejemplo, un gen que codifica una proteína marcadora puede situarse después del gen primario de interés para permitir la identificación de células que están expresando la proteína deseada. En una realización, una proteína marcadora

fluorescente, preferentemente proteína verde fluorescente (GFP), se incorpora en la construcción junto con el gen de interés. Si se incluye un segundo gen indicador, también se incluye preferentemente una secuencia del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) (patente de EE.UU. N.º 4.937.190). La secuencia de IRES puede facilitar la expresión del gen indicador.

5 La construcción viral también puede contener elementos genéticos adicionales. Los tipos de elementos que pueden incluirse en la construcción no están limitados de ningún modo y serán elegidos por el profesional habitual para lograr un resultado particular. Por ejemplo, puede incluirse una señal que facilita la entrada nuclear del genoma viral en la célula diana. Un ejemplo de una señal tal es la señal flap del VIH-1.

10 Además, pueden incluirse elementos que facilitan la caracterización del sitio de integración del provirus en el genoma del animal. Por ejemplo, puede incluirse una secuencia de supresor de ámbar de ARNt en la construcción.

15 Además, la construcción puede contener uno o más elementos genéticos diseñados para potenciar la expresión del gen de interés. Por ejemplo, un elemento sensible al virus de la hepatitis de la marmota (WRE) puede ponerse en la construcción (Zufferey et al. J Virol. 74:3668-3681 (1999); Deglon et al. Hum. Gene Ther. 11 :179-190 (2000)).

20 También puede incluirse un aislante de la  $\beta$ -globina de pollo (Chung et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:575-580 (1997)) en la construcción viral. Se ha mostrado que este elemento reduce la probabilidad de silenciar el provirus integrado en el animal no humano transgénico debido a efectos de metilación y heterocromatinización. Además, el aislante puede proteger al potenciador interno, promotor y gen exógeno de los efectos posicionales positivos o negativos del ADN de alrededor en el sitio de integración sobre el cromosoma.

25 Cualquier elemento genético adicional se inserta preferentemente 3' del gen de interés.

El vector viral puede comprender: una secuencia de potenciador/promotor del citomegalovirus (CMV); las secuencias R y U5 de la LTR de 5' del VIH; la secuencia flap del VIH-1; un potenciador interno; un promotor interno; un gen de interés; el elemento sensible al virus de la hepatitis de la marmota; una secuencia de supresor de ámbar de ARNt; un elemento U3 con una delección de su secuencia de potenciador; el aislante de la  $\beta$ -globina de pollo; y las secuencias R y U5 de la LTR de 3' del VIH.

30 La construcción viral se clona preferentemente en un plásmido que puede transfectarse en una línea celular de encapsidación. El plásmido preferido comprende preferentemente secuencias útiles para la replicación del plásmido en bacterias.

#### 35 Producción de virus

Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para producir partículas retrovirales infecciosas cuyo genoma comprende una copia de ARN de la construcción viral descrita anteriormente.

40 Preferentemente, la construcción viral se introduce en una línea celular de encapsidación. La línea celular de encapsidación proporciona las proteínas virales que se requieren en *trans* para la encapsidación del ARN genómico viral en partículas virales. La línea celular de encapsidación puede ser cualquier línea celular que sea capaz de expresar proteínas retrovirales. Las líneas celulares de encapsidación preferidas incluyen 293 (ATCC CCL X), HeLa (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) y Cf2Th (ATCC CRL 1430). La línea celular más preferible es la línea celular 293.

45 La línea celular de encapsidación puede expresar establemente las proteínas virales necesarias. Una línea celular de encapsidación tal se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 6.218.181. Alternativamente, una línea celular de encapsidación puede transfectarse transitoriamente con plásmidos que comprenden ácido nucleico que codifica las proteínas virales necesarias.

50 Una línea celular de encapsidación que expresa establemente las proteínas virales requeridas para la encapsidación del genoma de ARN puede transfectarse con un plásmido que comprende la construcción viral descrita anteriormente.

55 Alternativamente, una línea celular de encapsidación que no expresa establemente las proteínas virales necesarias puede co-transfectarse con dos o más plásmidos esencialmente como se describe en Yee et al. (Methods Cello Biol. 43A, 99-112 (1994)). Uno de los plásmidos comprende la construcción viral que comprende el transgén. El (Los) otro(s) plásmido(s) comprende(n) ácido nucleico que codifica las proteínas necesarias para permitir que las células produzcan virus funcional que es capaz de infectar la célula huésped deseada.

60 La línea celular de encapsidación puede no expresar productos de genes de la envoltura. En este caso, la línea celular de encapsidación encapsidará el genoma viral en partículas que carecen de una proteína de la envuelta. Como la proteína de la envuelta es responsable, en parte, de la variedad de huéspedes de las partículas virales, los virus están preferentemente pseudotipificados. Así, la línea celular de encapsidación se transfecta preferentemente

con un plásmido que comprende secuencias que codifican una proteína asociada a la membrana que permitirá la entrada del virus en una célula huésped. Un experto en la materia será capaz de elegir el pseudotipo apropiado para la célula huésped que va a usarse. Por ejemplo, en una realización, los virus se pseudotipan con la glucoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSVg). Además de conferir una variedad de huéspedes específica, este pseudotipo puede permitir que el virus se concentre a un título muy alto. Los virus pueden ser alternativamente pseudotipificados con proteínas de la envuelta ecotrópicas que limitan la infección a una especie específica, tal como ratones o aves. Por ejemplo, puede usarse proteína de la envuelta ecotrópica mutante, tal como la proteína de la envuelta ecotrópica 4.17 (Powell et al. Nature Biotechnology 18(12): 1279-1282 (2000)).

Una línea celular de encapsidación que no expresa establemente proteínas virales puede transfectarse con la construcción viral, un segundo vector que comprende el vector de encapsidación del VIH-1 con secuencias de *env*, *nef*, LTR de 5', LTR de 3' y *vpu* deletionadas, y un tercer vector que codifica una glucoproteína de la envuelta. Preferentemente, el tercer vector codifica la glucoproteína de la envuelta VSVg.

La actividad de interferencia por ARN de las células de encapsidación puede suprimirse para mejorar la producción de virus recombinante. Esto incluye, sin limitación, el uso de cotransfección o transfección estable de construcciones que expresan moléculas de ARNip para inhibir Dicer, un miembro de la familia de RNasa III de la ribonucleasa que es esencial para la interferencia por ARN (Hammond et al. Nat. Rev. Genet. 2:110-119 (2001)).

El virus recombinante se purifica entonces preferentemente a partir de las células de encapsidación, se valora y se diluye a la concentración deseada.

#### Animales transgénicos

Con el fin de producir animales no humanos transgénicos, un ovocito o una o más células embrionarias no humanas se infectan con el virus recombinante producido como se ha descrito anteriormente. Un experto en la materia reconocerá que el método de infección y el tratamiento de la célula tras la infección dependerán del tipo de animal del que se obtiene la célula. Por ejemplo, células de mamífero se implantan preferentemente en una hembra pseudopreñada no humana tras la infección, mientras que para la generación de aves o peces transgénicos, el virus se administra preferentemente a un huevo puesto y así no se requiere la implantación.

Mientras que métodos tempranos de producción de animales transgénicos no humanos requirieron que las células estuvieran rápidamente dividiéndose, no hay tal requisito en los métodos de la presente invención. Así, la célula puede ponerse en contacto en cualquier punto en el desarrollo. Por ejemplo, un cigoto no humano puede ponerse en contacto con el virus recombinante.

Las células que van a infectarse con el virus pueden obtenerse por cualquier método conocido en la técnica y apropiado para la especie específica en la que se desea producir un animal no humano transgénico. Por ejemplo, la recuperación de ovocitos de ratón fecundados se describe en Hogan et al. (Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1994)). Un método de obtención de ovocitos de rata fecundados se describe en Armstrong et al. (Biol. Reprod. 39,511-518 (1998)).

No es necesario que las células se pongan en contacto después de la fecundación. Por ejemplo, el virus puede administrarse a óvulos sin fecundar. El desarrollo puede entonces iniciarse, por ejemplo, por fecundación *in vitro*.

#### Administración del virus

El virus puede administrarse a la célula de cualquier modo que permita que el virus infecte la célula. Preferentemente, se deja que el virus se ponga en contacto con la membrana celular. A continuación se describen dos métodos preferidos de administración del virus a células de mamífero, inyección y contacto directo.

#### Inyección

El virus puede inyectarse en el espacio perivitelino entre la zona pelúcida y la membrana celular de un cigoto unicelular no humano. Se inyectan preferentemente menos de 50 picolitros de suspensión viral, más preferentemente menos de 25 picolitros e incluso más preferentemente aproximadamente 10 picolitros.

El virus está preferentemente presente en una suspensión viral y puede inyectarse por cualquier método conocido en la técnica. La suspensión viral se inyecta preferentemente mediante un inyector hidráulico. Se usa más preferentemente una micropipeta de vidrio para inyectar el virus. Puede prepararse una micropipeta estirando capilar de borosilicato vidrio sobre un estirador de pipetas. La punta se abre preferentemente y se bisela a aproximadamente 10 µm. La suspensión lentiviral puede cargarse en la micropipeta desde la punta usando presión negativa suave.

La célula puede estabilizarse con una pipeta de contención montada en un micromanipulador, tal como por presión negativa suave contra una pipeta pulida al fuego, y se usa un segundo micromanipulador para dirigir la punta de una micropipeta en el espacio entre la zona pelúcida y la membrana celular, donde se inyecta el virus.

Contacto directo

- 5 En otra realización, la zona pelúcida se elimina de la célula para producir un embrión no humano desnudo y la membrana celular se pone en contacto con el virus. La zona pelúcida puede eliminarse por cualquier método conocido en la técnica. Preferentemente se elimina por tratamiento enzimático. Por ejemplo, puede usarse tratamiento con pronasa para eliminar la zona pelúcida mientras que la membrana celular se mantiene intacta. Alternativamente, la célula puede ponerse en medio al pH al que la zona pelúcida se disuelve mientras que la membrana celular sigue intacta. Por ejemplo, la célula puede incubarse en una disolución ácida de Tyrode a temperatura ambiente durante varios minutos. Una vez se elimina la zona pelúcida, puede usarse cualquier método que permita que el virus se ponga en contacto con la membrana celular. Preferentemente, la célula se incuba en una disolución que contiene el virus. Incluso más preferentemente, la disolución es medio que facilita la supervivencia de la célula.
- 10
- 15 Las células se ponen preferentemente en contacto con el virus en placas de cultivo. El virus puede suspenderse en medio y añadirse a los pocillos de una placa de cultivo de múltiples pocillos. Las células pueden entonces sembrarse en placa en los pocillos individuales. El medio que contiene el virus puede añadirse antes de la siembra de las células o después de que las células se hayan sembrado. Preferentemente se incuban células individuales en aproximadamente 10 µl de medio. Sin embargo, puede usarse cualquier cantidad de medio en tanto que una concentración de virus apropiada se mantenga en los medios de forma que se produzca la infección de la célula huésped.
- 20
- 25 Las células se incuban preferentemente con el virus durante una cantidad de tiempo suficiente para permitir que el virus infecte las células. Preferentemente, las células se incuban con virus durante al menos 1 hora, más preferentemente al menos 5 horas e incluso más preferentemente al menos 10 horas.
- 30 Tanto las realizaciones de inyección como de contacto directo pueden aumentarse de escala ventajosamente para permitir transgénesis de alto rendimiento. Debido a la simplicidad relativa de la técnica de inyección, es posible inyectar muchos embriones no humanos rápidamente. Por ejemplo, es posible inyectar más de 200 ovocitos no humanos fecundados en menos de una hora. Con respecto a la realización de contacto directo, puede incubarse cualquier número de embriones no humanos en la suspensión viral simultáneamente. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, sembrando el número deseado de cigotos unicelulares en placas de cultivo de tejido de múltiples pocillos que contienen el virus suspendido en medio apropiado para la supervivencia y el crecimiento de las células.
- 35 En ambas realizaciones, puede usarse cualquier concentración de virus que sea suficiente para infectar la célula. Preferentemente, la concentración es al menos 1 ufp/µl, más preferentemente al menos 10 ufp/µl, incluso más preferentemente al menos 400 ufp/µl e incluso más preferentemente al menos  $1 \times 10^4$  ufp/µl.
- 40 Tras la infección con el virus, las células se implantan preferentemente en un animal no humano. Más preferentemente, las células infectadas con el virus se implantan en animales pseudopreñados de la misma especie de la que se obtuvieron las células infectadas. Métodos de creación de pseudo-embarazo en animales e implantación de embriones son muy conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Hogan et al. (Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1994)).
- 45 Se prefiere transferir embriones no humano de etapa temprana (aproximadamente 0 - 2,5 días p.c.) todavía con una zona pelúcida intacta al oviducto de hembras no humanas pseudopreñadas controladas (preferentemente 0,5 días p.c.), mientras que embriones no humanos que han alcanzado el estadio de blastocisto se transfieren al útero de hembras pseudopreñadas controladas (preferentemente 2,5 días p.c.). Los embriones desnudos se cultivan preferentemente *in vitro* hasta que alcanzan el estadio de mórula o de blastocisto (48 a 72 horas en cultivo), y luego se implantan en hembras pseudopreñadas apropiadamente controladas.
- 50
- 55 Los embriones no humanos y animales resultantes pueden analizarse, por ejemplo, para la integración del transgén, el número de copias del transgén que se integraron, la localización de la integración, la capacidad para transmitir el transgén a la progenie y la expresión del transgén. Tales análisis pueden llevarse a cabo en cualquier momento y pueden llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica. Técnicas convencionales se describen, por ejemplo, en Hogan et al. (arriba).
- 60 Los métodos de infección de las células desvelados anteriormente no dependen de características específicas de especie de las células. Como resultado, se extienden fácilmente a todas las especies de mamífero.
- 65 Experimentos iniciales con ratones indican que de aquellos animales que se desarrollan a término, el 80-90 % llevaron al menos una copia del transgén y que, de estos, aproximadamente el 85 % expresan el gen de interés. De los animales no humanos transgénicos aproximadamente el 25 % llevan solo 1 o 2 copias del transgén. El mayor número de inserciones provirales observadas fue aproximadamente 30. De los animales que solo llevaban 1 o 2 copias del transgén, aproximadamente el 80 % expresaron el gen de interés.

Como se trata anteriormente, los retrovirus modificados pueden pseudotipificarse para conferir tras ello una amplia variedad de huéspedes. Un experto en la materia también conoce promotores internos apropiados para lograr la expresión deseada de un gen de interés en una especie de animal particular. Así, un experto en la materia será capaz de modificar el método de infección de células para crear animales transgénicos de cualquier especie.

Pueden crearse aves transgénicas administrando un retrovirus modificado, como se ha descrito anteriormente, a las células germinativas primordiales de embriones aviares de etapa temprana. Se obtienen huevos recién puestos y se disponen en una estufa de incubación humidificada de temperatura controlada. Preferentemente, el blastodisco embrionario en el huevo se gira gradualmente para situarse encima de la yema. Esto puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica, tal como balanceando suavemente el huevo regularmente, preferentemente cada 15 minutos. Aproximadamente 36 horas después, el retrovirus modificado se administra en el espacio entre el disco embrionario y la membrana perivitelina. Se administran preferentemente aproximadamente 50 nl de disolución viral, se administran más preferentemente aproximadamente 100 nl de disolución viral, y se administran incluso más preferentemente aproximadamente 200 nl de disolución viral. La disolución viral puede administrarse por cualquier método conocido en la técnica para administrar composiciones al interior de un huevo. Puede abrirse una ventana en la cáscara, la disolución viral se inyecta a través de la ventana y se cierra la ventana de la cáscara. Los huevos se incuban preferentemente hasta la eclosión. Los huevos eclosionarán después de aproximadamente 20 días, dependiendo de las especies aviares particulares de las que se obtienen. Los pollitos eclosionados se crían preferentemente hasta la madurez sexual y se aparean. La descendencia transgénica de los animales fundadores puede identificarse por cualquier método conocido en la técnica, tal como transferencia Southern, PCR y análisis de expresión.

Pueden crearse peces transgénicos administrando el retrovirus modificado, descrito anteriormente, a embriones de pez unicelulares. Se recogen huevos de pez fecundados por cualquier método conocido en la técnica. El retrovirus modificado se administra entonces preferentemente al espacio entre el corión y la membrana celular. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, cargando el retrovirus modificado en disolución en una pipeta de vidrio. La pipeta puede entonces usarse para perforar la membrana del corión y administrar la suspensión viral. Se administran preferentemente aproximadamente 50 nl de disolución de viral, se administran más preferentemente aproximadamente 100 nl de disolución viral, y se administran incluso más preferentemente aproximadamente 200 nl de disolución viral. Los embriones inyectados se devuelven preferentemente a un tanque de agua de temperatura controlada y se dejan madurar. En la madurez sexual, los peces fundadores se aparean preferentemente y su progenie se analiza para la presencia del transgén por cualquier método conocido en la técnica.

Como se ha mencionado anteriormente, los métodos de la presente invención también demostrarán ser útiles en técnicas para identificar genes que participan en procesos biológicos específicos, tales como ensayos de trampa de genes y cribados por mutagénesis a gran escala. Tales métodos se describen en la solicitud de patente provisional en tramitación con la presente 60/322.031 presentada el 13/09/2001 y la solicitud de patente provisional de EE.UU. en tramitación con la presente 60/347.782 presentada el 09/01/2002.

#### Regulación por disminución de la expresión génica en una célula diana

Los métodos descritos en el presente documento permiten la expresión de moléculas de ARN en células, y son particularmente adecuados para la expresión de moléculas de ARN pequeño, que no pueden ser fácilmente expresadas de un promotor Pol II. Según una realización preferida de la invención, una molécula de ARN se expresa dentro de una célula con el fin de regular por disminución la expresión de un gen diana. La capacidad para regular por disminución un gen diana tiene muchas aplicaciones terapéuticas y de investigación, que incluyen identificar las funciones biológicas de genes particulares. Usando las técnicas y composiciones de la invención, será posible silenciar (o regular por disminución) la expresión de un gran número de genes, tanto en cultivo celular como en organismos de mamífero.

Un casete de expresión de ARN comprende un promotor Pol III y una región codificante de ARN. La región codificante de ARN codifica preferentemente una molécula de ARN que es capaz de regular por disminución la expresión de un gen particular o genes. La molécula de ARN codificada puede, por ejemplo, ser complementaria a la secuencia de una molécula de ARN que codifica un gen que va a regularse por disminución. La molécula de ARN actúa preferentemente mediante un mecanismo antisentido.

También se desvela la expresión de un complejo de ARN bicatenario, o una molécula de ARN que tiene una estructura de tallo-bucle o una llamada "horquilla". Como se usa en el presente documento, el término "dúplex de ARN" se refiere a las regiones bicatenarias de tanto el complejo de ARN como la región bicatenaria de la estructura de horquilla o de tallo-bucle.

Se ha mostrado que el ARN bicatenario inhibe la expresión génica de genes que tienen una secuencia complementaria mediante un proceso llamado interferencia por ARN o supresión (véase, por ejemplo, Hammond et al. Nat. Rev. Genet. 2:110-119 (2001)).

Según la invención, un dúplex de ARN o ARNip correspondiente a una región de un gen que va a regularse por

disminución se expresa en la célula. El dúplex de ARN es sustancialmente idéntico (normalmente al menos aproximadamente el 80 % idéntico, más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % idéntico) en secuencia con respecto a la secuencia del gen elegida como diana para la regulación por disminución. Los dúplex de ARN se describen, por ejemplo, en Bummelkamp et al. Science 296:550-553 (2002), Caplen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9742-9747 (2001) y Paddison et al. Genes & Devel. 16:948-958 (2002).

El dúplex de ARN tiene generalmente al menos aproximadamente 15 nucleótidos de longitud y tiene preferentemente aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. Sin embargo, en algunos organismos puede usarse eficazmente un dúplex de ARN significativamente más largo. El dúplex de ARN puede tener entre aproximadamente 19 y 22 nucleótidos de longitud. El dúplex de ARN es preferentemente idéntico a la secuencia de nucleótidos diana sobre esta región.

Cuando el gen que va a regularse por disminución está en una familia de genes altamente conservados, la secuencia de la región de dúplex puede elegirse con la ayuda de comparación de secuencias para dirigirse solo al gen deseado. Por otra parte, si hay identidad suficiente entre una familia de genes homólogos dentro de un organismo, puede diseñarse una región de dúplex que regularía por disminución una pluralidad de genes simultáneamente.

El ARN dúplex puede expresarse en una célula a partir de una única construcción retroviral. En la realización preferida, una única región codificante de ARN en la construcción sirve de molde para la expresión de un ARN de horquilla auto-complementario, que comprende una región sentido, una región de bucle y una región antisentido. Esta realización se ilustra en la Figura 2, que muestra una vista esquemática de un casete de expresión de ARN que tiene un promotor de ARN Pol III 100 operativamente unido a una región codificante de ARN, que tiene una región sentido 110, una región de bucle 120, una región antisentido 130 y una región terminadora 140. Las regiones sentido 110 y antisentido 130 tienen cada uno preferentemente aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. La región de bucle 120 tiene preferentemente aproximadamente 2 a aproximadamente 15 nucleótidos de longitud, más preferentemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 nucleótidos de longitud. Tras la expresión, las regiones sentido y antisentido forman un dúplex.

En otra realización, la construcción retroviral comprende dos regiones codificantes de ARN. La primera región codificante es un molde para la expresión de un primer ARN y la segunda región codificante es un molde para la expresión de un segundo ARN. Tras la expresión, el primer y segundo ARN forman un dúplex. La construcción retroviral también comprende preferentemente un primer promotor Pol III operativamente unido a la primera región codificante de ARN y un segundo promotor Pol III operativamente unido a la segunda región codificante de ARN. Esta realización se ilustra en la Figura 3, que muestra una vista esquemática de un casete de expresión de ARN que tiene un promotor de ARN polimerasa III 100 unido a una primera región codificante de ARN 110 y una primera secuencia de terminación 140 y un segundo promotor de ARN polimerasa III 105 unido a una segunda región codificante de ARN 115 y un segundo terminador 145.

En otra realización más de la invención, la construcción retroviral comprende un primer promotor de ARN Pol III operativamente unido a una primera región codificante de ARN y un segundo promotor de ARN Pol III operativamente unido a la misma primera región codificante de ARN en la dirección opuesta, de forma que la expresión de la región codificante de ARN del primer promotor de ARN Pol III produzca una síntesis de una primera molécula de ARN como la hebra codificante y la expresión de la región codificante de ARN del segundo promotor de ARN Pol III produzca la síntesis de una segunda molécula de ARN como una hebra no codificante que es sustancialmente complementaria a la primera molécula de ARN. En una realización tal, ambos promotores de ARN polimerasa III se separan de la región codificante de ARN por secuencias de terminación, preferentemente secuencias de terminación que tienen cinco restos de T consecutivos. La Figura 4 muestra una vista esquemática de un casete de expresión de ARN que tiene un primer promotor de ARN polimerasa III 100 unido a una región codificante de ARN 110 y una primera secuencia de terminación 145. El casete de expresión tiene un segundo promotor de ARN polimerasa III 105 unido a la región codificante de ARN 115, la misma secuencia que 110 en inversa, y un segundo terminador 140.

En realizaciones adicionales, se expresa un dúplex de ARN usando dos o más construcciones retrovirales. En una realización, se usa una primera construcción retroviral que dirige la expresión de un primer ARN y se usa una segunda construcción retroviral que dirige la expresión de un segundo ARN que es complementario al primero. Tras la expresión, el primer y el segundo ARN forman una región de dúplex. Se prefiere, sin embargo, que la región de dúplex entera se introduzca usando partículas retrovirales derivadas de una única construcción retroviral. Como se trata anteriormente, varias estrategias para expresar un dúplex de ARN a partir de una única construcción viral se muestran en las Figuras 2-4.

Los dúplex de ARN pueden flanquearse por regiones monocatenarias en un o ambos lados del dúplex. Por ejemplo, en el caso de la horquilla, la región de bucle monocatenaria conectaría la región de dúplex en un extremo.

La región codificante de ARN está generalmente operativamente unida a una secuencia de terminación. Los terminadores Pol III comprenden preferentemente estiramientos de 4 o más restos de timidina ("T"). Una agrupación

de 5 T consecutivas puede unirse inmediatamente en la dirección 3' de la región codificante de ARN para servir de terminador. En una construcción tal, la transcripción de Pol III se termina en la segunda o tercera T del molde de ADN, y así solo 2 a 3 restos de uridina ("U") se añaden al extremo 3' de la secuencia codificante.

5 La secuencia de la región codificante de ARN, y así la secuencia del dúplex de ARN, se eligen preferentemente para ser complementarias a la secuencia de un gen cuya expresión va a regularse por disminución en una célula o organismo. El grado de regulación por disminución logrado con una secuencia de dúplex de ARN dada para un gen  
10 diana dado variará por secuencia. Un experto en la materia será capaz de identificar fácilmente una secuencia eficaz. Por ejemplo, con el fin de maximizar la cantidad de supresión en un animal transgénico, pueden probarse varias secuencias para su eficacia en cultivo celular antes de generar un animal transgénico.

Los métodos de la presente invención encontrarán gran aplicación comercial, por ejemplo, en biotecnología, medicina y agricultura. Por ejemplo, en agricultura, los métodos descritos pueden usarse para conferir resistencia a  
15 enfermedad expresando en una célula u organismo un ARNip que regula específicamente por disminución la expresión de un gen asociado a un patógeno o estado de enfermedad. En biotecnología, la capacidad de desarrollar rápidamente grandes números de animales transgénicos con modulación deseada de los genes específicos permitirá el análisis de la función génica y la evaluación de compuestos que posiblemente modulan la expresión  
20 génica, función de proteínas, y son útiles en el tratamiento de una enfermedad o trastorno. En particular, observando el efecto de la regulación por disminución específica genes en animales transgénicos, puede determinarse la función biológica de aquellos genes. En medicina, los métodos de la invención pueden usarse para tratar pacientes que padecen enfermedades o trastornos particulares, tales como VIH, o para conferir inmunidad o resistencia a patógenos particulares. Por ejemplo, pueden infectarse células específicas *in vivo* o *ex vivo* con retrovirus recombinante que codifica un ARNip que regula por disminución la actividad de un gen cuya actividad está asociada con una enfermedad o trastorno particular.

25 Los siguientes ejemplos se ofrecen para fines ilustrativos solo, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ningún modo.

### 30 Ejemplos

#### Ejemplo 1

Se construyó una construcción lentiviral por la inserción de un casete de expresión de ARNip en el sitio PacI del vector HC-FUGW (Figura 5; SEQ ID NO: 2). El ARNip se diseñó para regular por disminución la expresión del gen  
35 lacZ. El vector HC-FUGW comprendió un marcador de gen GFP operativamente unido al promotor de ubiquitina humano. El marcador de GFP fue útil para seguir los eventos de transducción. El vector también comprendió un elemento Flap de ADN del VIH para mejorar los títulos de virus, y WRE para la expresión de alto nivel de genes virales. El casete de expresión de ARNip estuvo compuesto de un promotor Pol III y una región codificante de ARN de horquilla pequeña, seguido de un sitio terminador Pol III. El promotor Pol III (SEQ ID NO:3) se derivó de la región  
40 -240 a -9 del promotor de ARN H1 humano y se clonó como un fragmento Eco R1 por amplificación por PCR a partir de ADN genómico de HEK293. El promotor Pol III está conectado a la región codificante de ARN en la dirección 3' por una secuencia conectora de 7 pares de bases para garantizar que la transcripción se inició con precisión en el primer nucleótido de la secuencia codificante de ARN. La región codificante de ARN de horquilla pequeña comprendió una secuencia de 19 nt correspondiente a la región 1900-1918 de la hebra codificante de la secuencia  
45 codificante del gen beta-galactosidasa (lacZ) bacteriano y la secuencia complementaria inversa perfecta de 19 nt separada por una región de bucle de 9 nt. El terminador comprendió 5 restos de timidina consecutivos unidos inmediatamente en la dirección 3' de la secuencia codificante de ARN. La secuencia del ARNip de horquilla se muestra en SEQ ID NO: 1.

#### 50 Ejemplo 2

Se logró la transducción de células de mamífero cultivadas con retrovirus derivado de la construcción retroviral descrita en el Ejemplo 1 (Figura 6). Se usó el vector retroviral que codifica una molécula de ARN de horquilla  
55 pequeña descrita en el Ejemplo 1 para transfectar células de mamífero cultivadas que expresan lacZ. Se observó una profunda disminución en la expresión de lacZ.

Se produjo virus de ARNip de lacZ por cotransfección del vector retroviral, un plásmido de virus auxiliar y plásmido de expresión de VSVg en células HEK293. Se recogieron las partículas de virus de los sobrenadantes de cultivo celular y se concentraron por ultracentrifugación. Se usaron las preparaciones de virus concentradas para infectar  
60 tanto fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) como células HEK293 que alojan tanto genes indicadores de lacZ como de luciferasa de luciérnaga (Luc). La infección se monitorizó por la señal de GFP que se expresa a partir del casete de gen marcador del vector viral. En las condiciones de este experimento, >98 % de las células de prueba fueron GFP+ y así se transdujeron satisfactoriamente. Los niveles de expresión de los genes indicadores lacZ y Luc se midieron por ensayos quimioluminiscentes usando kits comercialmente disponibles (kit de ensayo de lacZ de Roche y Luc de Promega). Los virus de ARNip de lacZ solo inhibieron la expresión de lacZ, pero no de Luc. La inhibición específica se determinó por la relación de la actividad de lacZ con respecto a la actividad de Luc. La

relación de lacZ/Luc de las células parentales no infectadas se estableció arbitrariamente a 1 y los valores de las células infectadas se calcularon por consiguiente. Como se muestra en la Figura 6, la transfección con el virus produjo una espectacular reducción en la cantidad de expresión del gen lacZ en tanto células MEK como HEK293.

5 También se preparó un vector lentiviral de ARNip de lacZ inducible por tet como se ilustra en la Figura 8. Se puso un gen represor de Tet (TetR; SEQ ID NO: 5) bajo el control del promotor de ubiquitina C humano de manera que su expresión pudiera monitorizarse por el marcador de GFP en la dirección 3'. El casete de ARNip anti-lacZ fue conducido por un promotor Pol III inducible por Tet derivado del promotor U6 humano (-328 a +1) que contiene un único sitio de unión a TetR (TetO1) entre la caja PSE y TATA (SEQ ID NO: 4). La secuencia codificante de TetR se amplió por PCR a partir de ADN genómico de la cepa TOP10 de *E. coli* y se clonó en una versión modificada de FUIGW como fragmento Bg12-EcoR1. En ausencia de tetraciclina, TetR se une a un promotor y su expresión se reprime. Tras la adición de tetraciclina, TetR se mueve desde el promotor y empieza la transcripción.

15 El casete de expresión de ARNip inducible por Tet fue capaz de regular la expresión génica en respuesta a tratamiento con doxiciclina. Se preparó virus a partir de la construcción retroviral que lleva el casete de ARNip de lacZ inducible por Tet y un represor de Tet bajo el control de un promotor de ubiquitina C y se usó para transducir células HEK293 que expresan tanto lacZ como luciferasa (293Z+Luc). Las células transducidas se trataron con 10 µg/ml de doxiciclina (Más Dox) durante 48 h o sin el tratamiento con doxiciclina como control (Sin Dox). Las actividades de LacZ y de luciferasa se midieron como se describe en las figuras previas. La actividad de supresión relativa se calcula como la relación de lacZ frente a luciferasa y el control Sin Dox se estableció arbitrariamente a 1. Como puede apreciarse en la Figura 9, en presencia de doxiciclina la supresión de la actividad de lacZ se potenció significativamente.

### Ejemplo 3

25 Este ejemplo demuestra la generación de animales transgénicos que expresan una molécula de ARNip codificada por un vector lentiviral. La expresión del ARNip específico de lacZ descrito en el Ejemplo 1 produjo una amplia supresión de la actividad de lacZ en ratones ROSA26+/-.

30 Ratones ROSA26+/- llevan una copia de un gen indicador lacZ ubicuamente expresado. Se usaron las preparaciones de virus de ARNip de lacZ descritas en el Ejemplo 2 para la inyección perivitelina de embriones unicelulares de ROSA26+/- obtenidos de donantes femeninos C57B1/6 sensibilizados con hormona x machos sementales ROSA26+/. Los embriones unicelulares inyectados se transfirieron posteriormente en el oviducto de receptores hembra pseudopreñados controlados. Fetos del día embrionario 15,5 a 17,5 (E15,5-17,5) se recuperaron de las madres gestantes. Se puntuó la transgénesis satisfactoria por señal de GFP positiva observada con los fetos bajo microscopio fluorescente. Se usaron extractos de proteína preparados a partir de los tejidos de las extremidades de los fetos para el ensayo quimioluminiscente de LacZ según las instrucciones del fabricante (Roche), y se determinaron concentraciones de proteína de los extractos de tejido por el ensayo de Bradford (BioRad). Los niveles de expresión de lacZ se expresaron como unidades de luz (UL) por µg de proteínas (UL/µg). Los fetos de E15,5-17,5 del apareamiento controlado de hembras C57B1/6 x machos ROSA26+/+ y hembras C57B1/6 x machos C57B1/6 sirvieron de controles positivos y negativos, respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 7. Los animales G1-G4 (aquellos tratados derivados de embriones infectados con el virus que comprenden la construcción de ARNip) mostraron expresión marcadamente reducida del gen lacZ en comparación con animales de control no tratados.

45 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSTITUTO DE TECNOLOGÍA DE CALIFORNIA  
IN, XIAO-FENG  
50 LOIS-CABALLE, CARLOS  
BALTIMORE, DAVID

<120> MÉTODO PARA LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ARN PEQUEÑO DENTRO DE UNA CÉLULA

55 <130> CALTE.010VPC

<150> 60/322.031  
<151> 13-09-2001

60 <150> 60/347.782  
<151> 09-01-2002

<150> 60/389.592  
<151> 18-06-2002

65 <150> Todavía no disponible (Expediente de agente No.: CALTE.011PR)

# ES 2 601 141 T3

<151> 27-08-2002

<160> 5

5 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 59

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220> >

<223> Esto representa un casete de ARNip que comprende secuencia bacteriana y conector sintético, bucle y secuencias terminadoras.

15

<400> 1

gatccccgtg accagcgaat acctgttca agagaacagg tattcgctgg tcactttt 59

<210> 2

20 <211> 9941

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> >

25 <223> Esta secuencia representa un vector lentiviral que comprende una secuencia de flap del virus de la inmunodeficiencia humana, una secuencia de variante de proteína verde fluorescente, una secuencia de promotor de ubiquitina humana y una secuencia de elemento regulador de la hepatitis de la marmota.

30

<400> 2

gtcgcgggat cgggagatct cccgatcccc tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg 60

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 601 141 T3

atgCcgcata gtttaagccag tatctgctcc ctgcttgtgt gttggaggctc gctgagtagt 120  
 gcgcgagcaa aatttaagct acaacaaggc aaggcttgac cgacaattgc atgaagaatc 180  
 5 tgcttagggt taggcgtttt gcectgcttc gcgatgtac ggccagatat acgcgttgac 240  
 attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg gtcattagtt catagcccat 300  
 atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga ccgcccacag 360  
 acccccgcctc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcc aatagggactt 420  
 tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaaactgc ccacttggca gtacatcaag 480  
 10 tgtatcatal gccaaagtacg cccctattg acgtcaatga taagcagcgc cggtaaatgg cccgcctggc 540  
 attatgcccc gtacatgacc ttatgggact ttctacttg gcagtacatc tacgtattag 600  
 tcatcgctat taccatgggtg atgcgggtttt ggcagtacat caatgggctg ggatagcggg 660  
 ttgactcagc gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc 720  
 accaaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc cgccccattg acgcaaatgg 780  
 gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagcgc gttttgcctg tactgggtct 840  
 15 ctctgggttag accagatctg agcctgggag ctctctggct aactagggaa cccactgctt 900  
 aagcctcaat aaagcttgcc ttgagtgtct caagtagtgt gtgccctct gttgtgtgac 960  
 tctggtaact agagatccct cagacccttt tagtcagtggt ggaaaatctc tagcagtggtc 1020  
 gccccaacag ggacttgaag gcgaaaggga aaccagagga gctctctcga cgcaggactc 1080  
 ggcttgctga agcgcgcacg gcaagagcgc aggggcggcg actggtgagt acgcccacaaa 1140  
 20 ttttgactag cggaggctag aaggagagag atgggtgcca gagcgtcagt attaagcggg 1200  
 ggagaattag atcgcgatgg gaaaaaatc ggtaaggcc agggggaaag aaaaaatata 1260  
 aattaaaaaca tatagtatgg gcaagcaggg agctagaacg attcgcagt aatcctggcc 1320  
 tgttagaac atcagaaggc tgtagacaaa tactgggaca gctacaacca tccctcaga 1380  
 caggatcaga agaacttaga tcattatata atacagtagc aacctctat tgtgtgcac 1440  
 25 aaaggataga gataaaagac accaaggagc cttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca 1500  
 aaagtaagac caccgcacag caagcggcgc ctgatcttca gacctggagg aggagatatg 1560  
 agggacaatt ggagaagtga attatataaa tataaagttag taaaaattga accattagga 1620  
 gtagcaccce ccaaggcaaa gagaagagtg gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata 1680  
 ggagctttgt ccttgggtt cttgggagca gcaggaagca ctatgggcgc agcgtcaatg 1740  
 acgctgacgg tacaggccag acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg 1800  
 30 ctgagggcta ttgagggcca acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag 1860  
 ctccaggcaa gaatcctggc tgtggaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt 1920  
 tggggttgct ctgaaaaact catttgacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt 1980  
 aataaatctc tggaaacagat ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt 2040  
 35 aacaattaca caagcttaat acactccta attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag 2100  
 aatgaacaag aattattgga attagataaa tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata 2160  
 acaaatggc tgtggtatat aaaattatc ataagtatag taggaggctt ggtaggttta 2220  
 agaatagttt ttgctgtact ttctatagtg aatagagtta ggcagggata ttaccatta 2280  
 tegtttcaga ccacctccc aaccccgagg ggaccgcaca ggcccgaagg aatagaagaa 2340  
 gaaggtggag agagagacag agacagatcc attcgattag tgaacggatc ggcactgctg 2400  
 40 ggcceaattc tgcagacaaa tggcagatc catccacaat tttaaaagaa aaggggggat 2460  
 tgggggttac agtgcagggg aaagaatagt agacataata gcaacagaca tacaactaa 2520  
 agaattacaa aaacaaatta caaaaatlca aaatlttccg gtttattaca gggacagcag 2580  
 agatccagtt tggttaatta aggggtgcagc ggctccgcgc ccgggttttg ggcctccc 2640  
 cgggcgcccc cctcctcacg gcgagcgtg ccacgtcaga cgaagggcg aggagcgtt 2700  
 45 ctgatccttc cgccggacg ctcaggacag cggccgctg ctcataagac tcggccttag 2760  
 aaccccagta tcagcagaag gacattttag gacgggactt ggggtgactct agggcactgg 2820  
 ttttcttcc agagagcggg acagggcagg aaaagtatc ccttctcggc gattctgccc 2880  
 agggatctcc gtggggcggg gaacgccgat gattatataa ggacgcgcgg ggtgtggcac 2940  
 agctagttcc gtcgcagccg ggatttgggt cgcggttctt gtttgggat cgtgtgac 3000  
 50 gtcacttggg gagtgcggg ctgctgggct ggccggggct ttcgtggccg ccggccgct 3060  
 cgggtgggacg gaagcgtgtg gagagaccgc caagggctgt agtctgggtc cgcgagcaag 3120  
 gttgcccga actgggggtt ggggggagcg cacaaaatgg cggctgttcc cgagtcttga 3180  
 atggaagacg cttgtaaggc gggctgtgag gtcgttgaag caaggtgggg ggcattggtg 3240  
 gccgcaagaa cccaaggtct tgaggccttc gctaagtgcg gaaagctctt attcgggtga 3300  
 gatgggctgg ggcaccatct ggggaccctg acgtgaagtt tgtcactgac tggagaactc 3360  
 55 gggtttgcg tctgggtgcg ggggcggcag ttatgcggtg ccgttgggca gtgcaccgt 3420  
 acctttggga gcgcgcgcct cgctcgtctc tgacgtcacc cgttctgttg gcttataatg 3480

60

65

ES 2 601 141 T3

5 caggggtgggg ccacctgccc gtaggtgtgc ggtaggcttt tctccgtcgc aggacgcagg 3540  
 gttcggggcct agggtaggct ctctgaatc gacaggcgcc ggacctctgg tgagggggagg 3600  
 gataagtggag gcgtcagttt ctttggtcgg ttttatgtac ctatcttctt aagtagctga 3660  
 agctccgggt ttgaactatg cgctcgggggt tggcgagtgt gttttgtgaa gtttttttagg 3720  
 caccttttga aatgtaatca tttgggtcaa tatgtaattt tcagtgttag actagtaaaag 3780  
 cttctgcagg tcgactctag aaaattgtcc gctaaattct ggccgttttt ggcttttttg 3840  
 10 ttagacagga tccccgggta ccggtcgcca ccatggtgag caaggggcag gagctgttca 3900  
 ccgggggtggt gcccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg 3960  
 tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gacctgaag ttcactctga 4020  
 ccacccggcaa gctgcccggt ccctggccca ccctcgtgac caccctgacc taogggcgtgc 4080  
 agtgcttcag ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc 4140  
 ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagaccc 4200  
 15 gcgcccagggt gaagtctcag ggcgacaccc tgggtgaaccg catcgagctg aagggcatcg 4260  
 acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca 4320  
 acgtctatat catggccgac aagcagaaga ccggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc 4380  
 caaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg 4440  
 gcgacggccc cgtgctgctg ccgacaacc actacctgag caccagtcgc gccctgagca 4500  
 20 aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg tctgctgga gttcgtgacc gccgcccggga 4560  
 tcaactctcg catggacgag ctgtacaagt aaagcggccg cgaactctaga attcgatate 4620  
 aagcttatcg ataatacaac tctggattac aaaatttgtg aaagattgac tggattctt 4680  
 aactatggtg ctctctttac gctatgtgga tactgtgctt taatgcctt gtatcatgct 4740  
 attgcttccc gtatggcttt tctttctccc tccctgtata aatcctggtt gctgtctct 4800  
 25 tatgaggagt tgtggcccgt tgtcaggcaa cgtggcgtgg tgtgcaactgt gtttgcctgac 4860  
 gcaaccccca ctggttgggg cattgcccacc acctgtcagc tcccttccgg gactttcgcct 4920  
 ttccccctcc ctattgcccac ggccggaactc atcgcgccct gccttgcccg ctgctggaca 4980  
 ggggctcggc tgttgggcac tgacaattcc gtgggtgtgt cggggaaatc atcgtccttt 5040  
 ccttggctgc tcgcctgtgt tgccacctgg attctgcgcg gaacgtcctt ctgctacgct 5100  
 30 ccttccggccc tcaatccagc ggaccttct tcccgcggcc tgcctgcccgc tctgcccct 5160  
 ctcccgctc ttcgccttcg cctcagacg agtcggatct ccttttgggc cgcctccccg 5220  
 catcgatacc gtcgacctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaag tagcaatata 5280  
 ccagctacea atgctgattg tgccctggcta gaagcacaag aggaggagga ggtgggtttt 5340  
 ccagtcacac ctcaggtacc ttaagacca atgacttaca aggcagctgt agatcttagc 5400  
 35 cactttttaa aagaaaagg gggactggaa gggctaattc actcccaacg aagacaagat 5460  
 atccttgatc tgtggatcta ccacacacaa ggctacttcc ctgattggca gaactacaca 5520  
 ccagggccag ggatcagata tccactgacc tttggatggt gctacaagct agtaccagtt 5580  
 gagcaagaga aggtagaaga agccaatgaa ggagagaaca cccgcttght acaccctgtg 5640  
 agcctgcctg ggatggatga cccggagaga caagtattag agtggaggtt tgacagccgc 5700  
 ctagcatttc atcacatggc ccgagagctg caatccggact gtactgggtc tctctggtta 5760  
 40 gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactagggga acccactgct taagcctcaa 5820  
 taaagcttgc cttgagtgct tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga ctctggtaac 5880  
 tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaaatc ctagcagggc ccgtttaaac 5940  
 ccgctgatac gccctcagctg tgccttctag ttgccagcca tctgttghtt gccctcccc 6000  
 cgtgccttcc ttgacctgg aagggtgccac tcccactgct ctttccctaat aaaatgagga 6060  
 45 aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg ggggggtgggg tggggcagga 6120  
 cagcaagggg gaggatcggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat 6180  
 ggcttctgag gcggaagaa ccagctgggg ctctaggggg tatccccacg cgccctgtag 6240  
 ggcgcatta agcgcggcgg gtgtgggtgt taogcgcagc gtgaccgcta cacttgccag 6300  
 cgccctagcg cccgctcctt tcgcttctt cccttcttct ctcgccaagt tcgcccgtt 6360  
 50 tcccgtcaa gctetaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca 6420  
 cctcgacccc aaaaaacttg attaggggtga tggttcacgt agtgggcat cgccctgata 6480  
 gacggttttt cgcccttga cgttggagtc caegtcttct aatagtgga ctttgtcca 6540  
 aactggaaca aactcaacc ctatctcggg ctattcttct gatttataag ggattttgcc 6600  
 gatttcggcc tattgggttaa aaaaatgagc gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt 6660  
 55 ctgtggaatg tgtgtcagtt aggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 6720  
 atgcaaagca tgcatctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccc 6780  
 gcaggcagaa gtatgcaaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgcccta 6840  
 actccgccc tcccgcctt aactccgccc agttccgccc attctccgccc ccatggctga 6900

60  
65

ES 2 601 141 T3

ctaatTTTTT ttatttatgc agagggccgag gccgcctctg cctctgagct attccagaag 6960  
 tagtgaggag gctTTTTTgg aggcctaggc ttttgcaaaa agctcccggg agcttgtata 7020  
 5 tccattttcg gatctgatca gcacgtgttg acaattaatc atcggcatag tatatcggca 7080  
 tagtataata cgacaagggtg aggaactaaa ccatggccaa gttgaccagt gccgttccgg 7140  
 tgctcaccgc gcgcgacgct gccggagcgg tccagttctg gaccgaccgg ctcgggttct 7200  
 cccgggactt cgtggaggac gaacttcgccg gtgtggtccg ggacgacgtg accctgttca 7260  
 tcagcgcggt ccaggaccag gtgggtgccg acaacaccct ggccctgggtg tgggtgcgcg 7320  
 gcctggacga gctgtacgcc gagtggtcgg aggtcgtgtc cacgaacttc cgggacgct 7380  
 10 ccgggcccgg catgaccgag atcggcagc agcctgtggg gccgggagttc gccctgcgcg 7440  
 acccggccgg caactgcgtg cacttcgtgg ccgaggagca ggactgacac gtgctacgag 7500  
 atttcgattc caccgcccgc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcgtt ttcggggacg 7560  
 ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc caccccaact 7620  
 tgtttattgc agcttataat ggttacaat aaagcaatag catcacaat ttcacaaata 7680  
 aagcattttt ttcactgcat tctagtgtg gttgtccaa actcatcaat gtatcttata 7740  
 15 atgtctgtat accgtcgacc tctagctaga gcttggcgta atcatggtca tagctgttcc 7800  
 ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaacaatc cacacaacat acgagccgga agcataaagt 7860  
 gtaaagcctg ggtgcccata tgagttagct aactcacatt aattgcgttg cgtcactgc 7920  
 ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcg 7980  
 ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgtctt ccgcttctc gctcactgac tcgctgcgct 8040  
 20 cggctcgtcg gctgcggcga gccggtatcag ctoactcaaa ggccggtaata cggttatcca 8100  
 cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga 8160  
 accgtaaaaa gccgcggttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcacc 8220  
 acaaaaaatc acgctcaagt cagaggtggc gaaaccggac aggactataa agataccagg 8280  
 cgtttcccc tggaaagctc ctcgtgcgct ctctgttcc gaccctgccc cttaccggat 8340  
 accgtcccg ctttctccct tcgggaagcg tggcgttcc tcatagctca cgtcttaggt 8400  
 25 atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccggtc 8460  
 agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg 8520  
 acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg 8580  
 gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg 8640  
 gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg 8700  
 30 gcaaaaaaac caccgctggg agcggtggtt ttttggttg caagcagcag attacgcgca 8760  
 gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtggg 8820  
 acgaaaaact acgttaaggg attttggta tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga 8880  
 tccttttaaa ttaaaaaatga agttttaa atcaatctaaag tatatatgag taaacttgg 8940  
 ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt 9000  
 35 catccatagt tgctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat 9060  
 ctggccccg tgctgcaatg ataccgcgag acccaagctc accggctcca gatttatcag 9120  
 caataaaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcttgcaact ttatccgct 9180  
 ccacccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt 9240  
 tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtagg 9300  
 40 ctccattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgtgtgca 9360  
 aaaaagcggg tagctcctc ggtcctccga tcgttgcag aagtaagttg gccgcagtgt 9420  
 tatcactcat ggttatggca gcaactgata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat 9480  
 gcttttctgt gactgggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagttg atgcggcgac 9540  
 cgagttgctc ttgcccgcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaacttta 9600  
 45 aagtgctcat cattggaaaa cgttcttcgg gccgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt 9660  
 tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg caccacaact atcttcagca tcttttactt 9720  
 tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa 9780  
 gggcgacacg gaaatggtga atactcatac tcttctttt tcaatattat tgaagcattt 9840  
 atcaggggta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaaciaa 9900  
 50 taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga c 9941

<210> 3  
 <211> 233  
 55 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3

60  
 65

ES 2 601 141 T3

5 gaattcgaac gctgacgtca tcaacccgct ccaaggaatc gggggcccag tgtcactagg 60  
 cgggaacacc cagcgcgcgt gcgccctggc aggaagatgg ctgtgagggg caggggagtg 120  
 gcgccctgca atatttgc at gtcgctatgt gttctgggaa atcaccataa acgtgaaatg 180  
 tctttggatt tgggaatctt ataagttctg tatgagacca cagatctaag ctt 233

10

<210> 4  
 <211> 355  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Esto representa una secuencia humana mutante que tiene un sitio de unión tetO1 bacteriano introducido.

20 <400> 4

gggaattccc ccagtggaaa gacgcgcagg caaaacgcac cacgtgacgg agcgtgaccg 60  
 cgcgcgcgagc ccaaggtcgg gcaggaagag ggcctatttc ccatgattcc ttcataattg 120  
 catatacgat acaaggctgt tagagagata attagaatta atttgactgt aaacacaaag 180  
 25 atattagtac aaaatacgtg acgtagaaag taataatttc ttgggtagtt tgcagtttta 240  
 aaattatggtt ttaaaatgga ctatcatatg cttaccgtaa cttgaaagta ctctatcatt 300  
 gatagagtta tatatcttgt ggaaaggacg aaacaccgtg gtcttcaagc ttccg 355

30

<210> 5  
 <211> 634  
 <212> ADN  
 35 <213> E. coli

<400> 5

40 gctagccacc atgtccagat tagataaaaag taaagtgatt aacagcgcac tagagctgct 60  
 taatgaggtc ggaatcgaag gtttaacaac ccgtaaaactc gcccagaagc taggtgtaga 120  
 gcagcctaca ttgtattggc atgtaaaaaa taagcgggct ttgctcgacg ccttagccat 180  
 tgagatgtta gataggcacc atactcactt ttgcccttta gaaggggaaa gctggcaaga 240  
 ttttttacgt aataacgcta aaagttttag atgtgcttta ctaagtcatc gcgatggagc 300  
 45 aaaagtacat ttaggtacac ggcctacaga aaaacagtat gaaactctcg aaaatcaatt 360  
 agccttttta tgccaacaag gtttttctact agagaatgca ttatatgcac tcagcgcgtg 420  
 ggggcatttt actttagggtt gcgtattgga agatcaagag catcaagtcg ctaaagaaga 480  
 aagggaaaca cctactactg atagtatgcc gccattatta cgacaagcta tcgaattatt 540  
 tgatcaccaa ggtgcagagc cagccttctt attcggcctt gaattgatca tatcgggatt 600  
 50 agaaaaacaa cttaaatgtg aaagtgggtc ttaa 634

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de expresión de una molécula de ARN dentro de una célula, comprendiendo el método:
- transfectar una línea celular de encapsidación con una construcción retroviral;
- recuperar un retrovirus recombinante de la línea celular de encapsidación; e
- 10 infectar una célula diana *in vitro* con el retrovirus recombinante,
- en el que la construcción retroviral comprende las secuencias R y U5 de una repetición terminal larga (LTR) lentiviral de 5', una LTR de 3' lentiviral auto-inactivante, un primer promotor de ARN polimerasa III, una secuencia de terminación de ARN polimerasa III y un transgén que comprende una primera región codificante de ARN operativamente unida a la primera región del promotor de ARN polimerasa III, y
- 15 en el que el promotor de ARN polimerasa III y la región codificante de ARN están situadas entre la LTR de 5' y la LTR de 3'.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que el promotor de ARN polimerasa III es inducible.
3. El método de la reivindicación 2, en el que un promotor inducible se activa con tetraciclina.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la primera región codificante de ARN codifica una molécula de ARN auto-complementaria que tiene una región sentido, una región antisentido y una región de bucle.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, en el que la región de bucle tiene 2 a 10 nucleótidos en longitud.
6. El método de la reivindicación 4, en el que la región sentido y la región antisentido tienen cada una entre 15 y 30 nucleótidos en longitud.
- 30 7. El método de la reivindicación 1, en el que la construcción retroviral comprende además una segunda región codificante de ARN operativamente unida a un segundo promotor de ARN polimerasa III.
- 35 8. El método de la reivindicación 7, en el que la primera región codificante de ARN codifica una primera molécula de ARN y la segunda región codificante de ARN codifica una segunda molécula de ARN.
9. El método de la reivindicación 8, en el que la primera molécula de ARN y la segunda molécula de ARN son sustancialmente complementarias.
- 40 10. El método de la reivindicación 1, en el que la construcción retroviral comprende además un segundo promotor de ARN polimerasa III operativamente unido a la primera región codificante de ARN, de forma que la expresión de la primera región codificante de ARN del primer promotor de ARN polimerasa III produce la síntesis de una primera molécula de ARN y la expresión de la segunda región codificante de ARN del segundo promotor de ARN polimerasa III produce la síntesis de una segunda molécula de ARN sustancialmente complementaria a la primera molécula de ARN.
- 45 11. El método de la reivindicación 1, en el que expresión de la región codificante de ARN produce la regulación por disminución de un gen diana, en el que el gen diana comprende una secuencia que es al menos aproximadamente el 90 % idéntica a la región codificante de ARN.
- 50 12. El método de la reivindicación 1, en el que dicha línea celular de encapsidación es una línea celular 293.
13. El método de la reivindicación 1, en el que las secuencias de LTR de 5' son del VIH.
- 55 14. El método de la reivindicación 1, en el que la construcción viral comprende la secuencia de elemento potenciador del virus de la hepatitis de la marmota.
15. El método de la reivindicación 1, en el que la construcción viral comprende una secuencia de supresor de ámbar de ARNt.
- 60 16. El método de la reivindicación 1, en el que la LTR de 3' auto-inactivante comprende un elemento U3 con una delección de su secuencia de potenciador.
- 65 17. El método de la reivindicación 16, en el que la LTR de 3' auto-inactivante es una LTR de 3' del VIH modificada.

18. El método de la reivindicación 1, en el que el retrovirus recombinante está pseudotipificado.
19. El método de la reivindicación 18, en el que el retrovirus recombinante se pseudotipifica con la glucoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular.
- 5 20. El método de la reivindicación 1, en el que la construcción viral comprende además un gen de interés.
21. El método de la reivindicación 20, en el que la construcción viral tiene un promotor de la polimerasa II operativamente unido al gen de interés.
- 10 22. El método de la reivindicación 21, en el que un promotor es un promotor del CMV.
23. El método de la reivindicación 21, en el que la construcción viral comprende adicionalmente un potenciador operativamente unido a un promotor.
- 15 24. El método de la reivindicación 23, en el que el potenciador y el promotor son secuencias de CMV.
25. El método de la reivindicación 20, en el que el gen de interés es un gen indicador.
- 20 26. El método de la reivindicación 25, en el que el gen indicador codifica una proteína fluorescente.
27. El método de la reivindicación 26, en el que la proteína fluorescente es proteína verde fluorescente.
28. El método de la reivindicación 21, en el que el promotor de polimerasa II es un promotor ubicuo.
- 25 29. El método de la reivindicación 28, en el que el promotor ubicuo está seleccionado del grupo que consiste en el promotor de ubiquitina, el promotor de  $\beta$ -actina del CMV y el promotor de pgk.
30. El método de la reivindicación 21, en el que el promotor de la polimerasa II es un promotor específico de tejido.
- 30 31. El método de la reivindicación 30, en el que dicho promotor específico de tejido está seleccionado del grupo que consiste en el promotor de lck, el promotor de miogenina y el promotor de thyl.
- 35 32. El método de la reivindicación 1, en el que la célula diana es una célula embrionaria no humana.
33. El método de la reivindicación 1, en el que infectar una célula diana comprende inyectar el retrovirus recombinante entre la zona pelúcida y la membrana celular de una célula embrionaria de mamífero no humana.
- 40 34. El método de la reivindicación 1, en el que infectar una célula diana comprende eliminar la zona pelúcida de una célula embrionaria de mamífero no humana e incubar la célula en disolución que contiene el retrovirus recombinante.
35. El método de la reivindicación 34, en el que la zona pelúcida se elimina por digestión enzimática.
- 45 36. El método de la reivindicación 1, en el que la célula diana es una célula cultivada.
37. El método de la reivindicación 36, en el que la célula diana es una célula de mamífero cultivada.
38. El método de la reivindicación 37, en el que la célula de mamífero cultivada está seleccionada del grupo que consiste en células CHO, HEK, COS y MEF.
- 50 39. El método de la reivindicación 1, en el que la célula diana es una célula embrionaria de un ave.
40. El método de la reivindicación 1, en el que la célula diana es un huevo de pez.
- 55 41. Una construcción retroviral para la expresión de una molécula de ARN dentro de una célula, comprendiendo la construcción retroviral:
- un ácido nucleico que tiene las secuencias R y U5 de una repetición terminal larga (LTR) lentiviral de 5';
- 60 una LTR de 3' lentiviral auto-inactivante;
- un promotor de ARN polimerasa III;
- un terminador de ARN polimerasa III; y
- 65 al menos un transgén que comprende una región codificante de ARN operativamente unida al promotor de

ARN polimerasa III;

en la que el promotor de ARN polimerasa III y la región codificante de ARN están situadas entre la LTR de 5' y la LTR de 3'.

- 5
42. La construcción retroviral de la reivindicación 41, en la que el promotor de ARN polimerasa III es inducible.
43. La construcción retroviral de la reivindicación 42, en la que un promotor inducible se activa con tetraciclina.
- 10 44. La construcción retroviral de la reivindicación 41, en la que la región codificante de ARN codifica una molécula de ARN auto-complementaria que tiene una región sentido, una región antisentido y una región de bucle.
45. La construcción retroviral de la reivindicación 44, en la que la región de bucle tiene 2 a 10 nucleótidos de longitud.
- 15 46. La construcción retroviral de la reivindicación 44, en el que la región sentido y la región antisentido tienen entre 15 y 30 nucleótidos de longitud.
- 20 47. La construcción retroviral de la reivindicación 41, en la que la región codificante de ARN codifica una primera molécula de ARN, y la construcción retroviral comprende además un segundo promotor de ARN polimerasa III y una segunda región codificante de ARN operativamente unida al segundo promotor de ARN polimerasa III, en la que la segunda región codificante de ARN codifica una segunda molécula de ARN sustancialmente complementaria a la primera molécula de ARN.
- 25 48. La construcción retroviral de la reivindicación 41, en la que la construcción retroviral comprende además un segundo promotor de ARN polimerasa III operativamente unido a la región codificante de ARN, de forma que la expresión de la región codificante de ARN del primer promotor de ARN polimerasa III produce una síntesis de una primera molécula de ARN y la expresión de la región codificante de ARN del segundo promotor de ARN polimerasa III produce la síntesis de una segunda molécula de ARN sustancialmente complementaria a la primera molécula de ARN.
- 30 49. La construcción retroviral de la reivindicación 41, en la que expresión de la región codificante de ARN produce la regulación por disminución de un gen diana.
- 35 50. La construcción retroviral de la reivindicación 49, en la que el gen diana comprende una secuencia que es al menos aproximadamente el 90 % idéntica a la región codificante de ARN.
51. La construcción retroviral de la reivindicación 41, en la que las secuencias de LTR de 5' son del VIH.
- 40 52. La construcción retroviral de la reivindicación 41, en la que la construcción retroviral comprende la secuencia de elemento potenciador del virus de la hepatitis de la marmota.
53. La construcción retroviral de la reivindicación 41, en el que la construcción retroviral comprende una secuencia de supresor de ámbar de ARNt.
- 45 54. La construcción retroviral de la reivindicación 41, en la que la LTR de 3' auto-inactivante comprende un elemento U3 con una delección de su secuencia de potenciador.
- 50 55. La construcción retroviral de la reivindicación 41, en la que la LTR de 3' auto-inactivante es un LTR de 3' del VIH modificada.
56. La construcción retroviral de la reivindicación 41, en la que el retrovirus recombinante está pseudotipificado.
57. La construcción retroviral de la reivindicación 56, en la que el retrovirus recombinante se pseudotipifica con la glucoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular.
- 55 58. La construcción retroviral de la reivindicación 41, en la que la construcción retroviral comprende además un gen de interés.
- 60 59. La construcción retroviral de la reivindicación 58, en la que la construcción retroviral tiene un promotor de la polimerasa II operativamente unido al gen de interés.
60. La construcción retroviral de la reivindicación 59, en la que el promotor de la polimerasa II es un promotor del CMV.
- 65 61. La construcción retroviral de la reivindicación 59, en la que la construcción viral comprende adicionalmente un

potenciador operativamente unido al promotor de la polimerasa II.

62. La construcción retroviral de la reivindicación 61, en la que el potenciador y el promotor de la polimerasa II son secuencias del CMV.

5 63. La construcción retroviral de la reivindicación 59, en la que el promotor de la polimerasa II es un promotor ubicuo.

10 64. La construcción retroviral de la reivindicación 63, en la que el promotor ubicuo está seleccionado del grupo que consiste en el promotor de ubiquitina, el promotor de  $\beta$ -actina del CMV y el promotor de pgk.

65. La construcción retroviral de la reivindicación 59, en la que el promotor de la polimerasa II es un promotor específico de tejido.

15 66. La construcción retroviral de la reivindicación 65, en la que dicho promotor específico de tejido está seleccionado del grupo que consiste en el promotor de lck, el promotor de miogenina y el promotor de thyl.

67. La construcción retroviral de la reivindicación 58, en la que el gen de interés es un gen indicador.

20 68. La construcción retroviral de la reivindicación 67, en la que el gen indicador codifica una proteína fluorescente.

69. La construcción retroviral de la reivindicación 68, en la que la proteína fluorescente es proteína verde fluorescente.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1A



FIGURA 1B

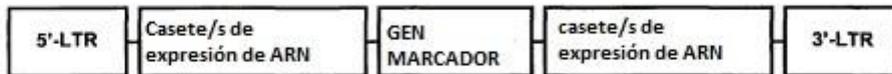


FIGURA 2

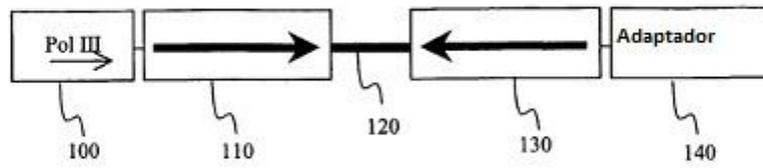


Figura 3

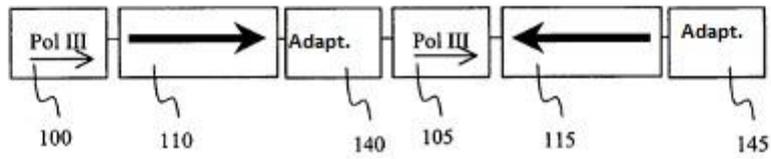


Figura 4

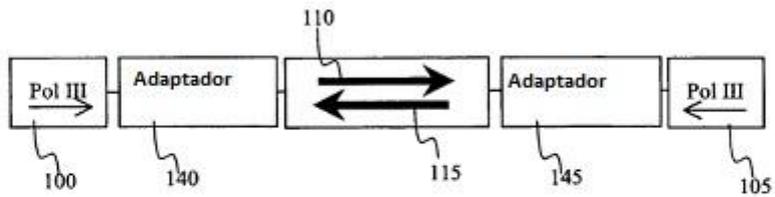


FIGURA 5

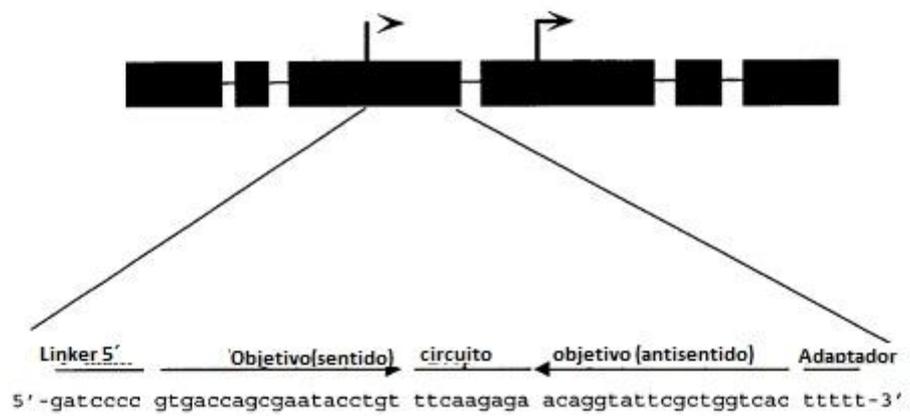


FIGURA 6

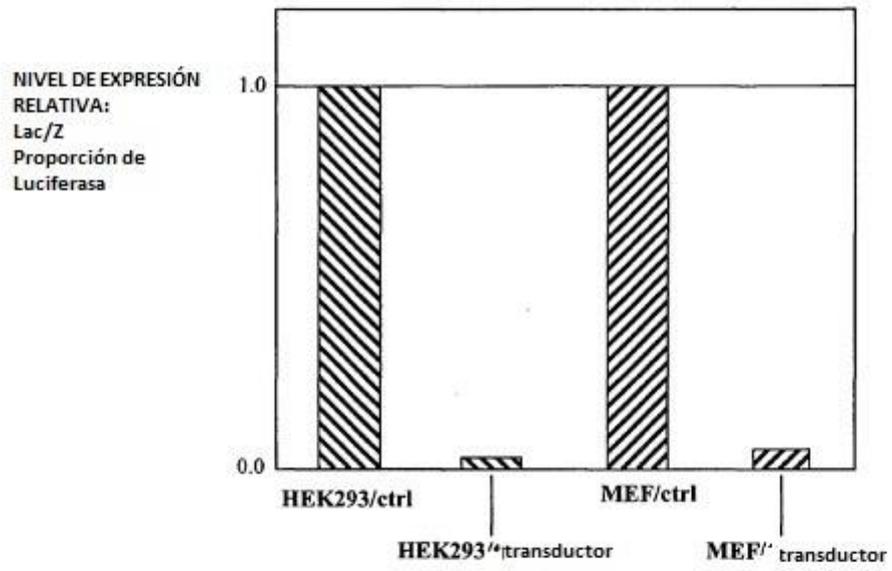


Figura 7

Supresión de la expresión del gen lacZ en embriones transgénicos lentiviral siARN LacZ

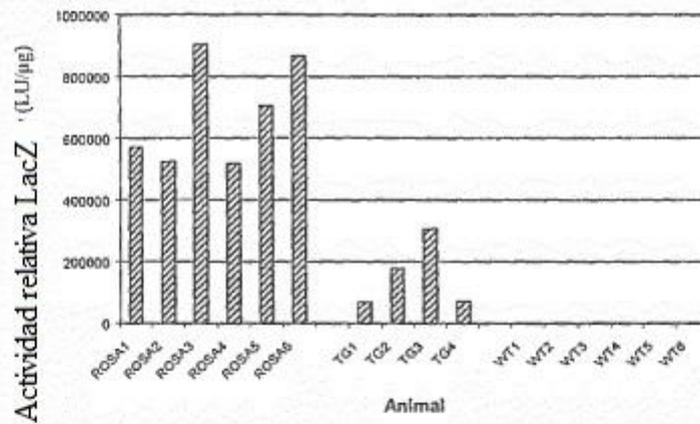


FIGURA 8

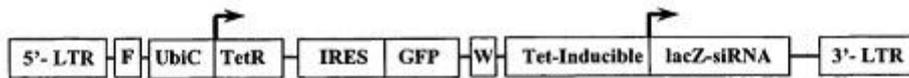


Figura 9

Supresión de la expresión génica por tet.inducible si-ARN

