

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 274**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2004 E 11187942 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017 EP 2476707**

54 Título: **Ribozimas de auto-escisión y usos de éstas**

30 Prioridad:

**14.11.2003 US 519941 P**

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

**19.10.2017**

73 Titular/es:

**CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION  
(100.0%)**

**55 Shattuck Street  
Boston, MA 02115, US**

72 Inventor/es:

**MULLIGAN, RICHARD y  
YEN, LAISING**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 638 274 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Ribozimas de auto-escisión y usos de éstas

**Antecedentes de la invención**

5 Las enzimas de ARN (ribozimas) se están desarrollando como tratamientos para una variedad de enfermedades que varían de trastornos metabólicos innatos a infecciones virales y enfermedades adquiridas tales como el cáncer. Las ribozimas pueden usarse tanto para regular a la baja como para reparar genes patogénicos. En algunos casos, es deseable la administración exógena a corto plazo de ARN estabilizado, pero muchos tratamientos requerirán la administración mediada por virus para proporcionar la expresión a largo plazo del catalizador terapéutico. Aunque están disponibles algunas variaciones en las ribozimas naturales, no han sido muy efectivas en células de mamíferos. Existe una necesidad de desarrollar ribozimas modificadas que muestren actividad y función mejoradas en células de mamíferos con alta eficiencia. Estas ribozimas son útiles para el desarrollo de sistemas de expresión génica regulada y tienen grandes valores terapéuticos.

10 WO 00/24912A describe el uso de un resto de ARN de auto-escisión para modular la expresión génica. Yen Laising et al: "Exogenous control of mammalian gene expression through the modulation of RNA self-cleavage", Nature (Londres), vol. 431, no. 7007, 2004-09-23, páginas 471-476. Ferbeyre G et al: "Schistosome satellite DNA encodes active hammerhead ribozymes". Molecular and Cellular Biology, julio 1998, vol. 18, no. 7, páginas 3880-3888. Salehi-Ashtiani K et al: "In vitro evolution suggests multiple origins for the hammerhead ribozyme", Nature 1 nov 2001 UK, vol. 414, no. 6859, páginas 82-84.

**Resumen de la invención**

20 La presente invención se refiere a una ribozima de auto-escisión según la reivindicación 1. En determinados aspectos, la presente invención proporciona una ribozima de auto-escisión, que escinde eficientemente una molécula de ARN que comprende la ribozima de auto-escisión en una célula de mamífero. El término "ribozima" tal y como se usa en la presente memoria, incluye ribozimas naturales (tipo salvaje) y ribozimas modificadas (referidas como mutantes o variantes). Una ribozima ejemplar de la invención es una ribozima de esquistosoma y mutantes de ésta.

25 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión, también referidos como restos mutantes de ARN de esquistosoma, mutantes de ribozima de esquistosoma y ribozimas de esquistosoma modificadas. Estos términos se usan en la presente memoria indistintamente. Los restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención incluyen una modificación en una posición en un resto de ARN de esquistosoma de auto-escisión que resulta en la modulación o alteración de la actividad de escisión del resto de ARN de esquistosoma de auto-escisión. Los restos de ARN de esquistosoma de auto-escisión o ribozimas de esquistosoma son miembros de la familia de ribozimas de cabeza de martillo y se caracterizan por su estructura secundaria. Las ribozimas de cabeza de martillo están compuestas por elementos estructurales incluyendo tres hélices, referidas como tallo I, tallo II y tallo III, y unidas a un núcleo central de 11-12 nucleótidos monocatenarios. Las ribozimas de cabeza de martillo también pueden contener estructuras de bucle que se extienden desde alguna o todas las hélices. Estos bucles se numeran según el tallo a partir del que se extienden (por ejemplo, bucle I, bucle II, y bucle III). Los mutantes de ARN de esquistosoma de la presente invención se diferencian de un ARN de esquistosoma de auto-escisión natural por una o más modificaciones, que pueden ser adición, delección, sustitución y/o alteración de al menos un (uno o más) nucleótido. Dichas modificaciones pueden resultar en la adición de elementos estructurales, tal como adición de un bucle o tallo; alargamiento o acortamiento de un tallo o bucle existente; cambios en la composición o estructura de uno o unos bucles o uno o unos tallos; o cualquier combinación de éstos.

35 En una realización, la presente invención se refiere a un resto de ARN de esquistosoma de auto-escisión modificado para incluir un bucle en el tallo III. Un bucle en el tallo III también se refiere en la presente memoria como un bucle III. Un resto de ARN de esquistosoma de auto-escisión incluyendo un bucle en el tallo III también se refiere en la presente memoria como un resto de ARN de esquistosoma de auto-escisión incluyendo un bucle III. Un resto de ARN de esquistosoma de auto-escisión incluyendo un bucle III es un ejemplo de un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención.

40 El resto de ARN de esquistosoma de auto-escisión natural no contiene un bucle en el tallo III. Como se describe en la presente memoria, la adición de un bucle III incrementa la actividad de escisión del resto de ARN de esquistosoma de auto-escisión. En una realización particular, el bucle en el tallo III (bucle III) comprende al menos tres nucleótidos. En una realización, el bucle III comprende 5'-UUCG-3'. En otra realización, el bucle III comprende 5'-CUUCGG-3'. En otra realización particular, el bucle III comprende 5'-GCUUCGGU-3'. Los bucles pueden comprender nucleótidos que pueden emparejarse por bases y resultar en estructuras no de bucle. La presente invención se refiere a restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión ilustrados en los ejemplos de trabajo.

45 La presente invención se refiere además a restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión incluyendo elementos estructurales o secuencias de nucleótidos adicionales que modulan la actividad de escisión de los restos

mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión descritos en la presente memoria, tal como restos de aptámero. Los restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la presente invención pueden comprender uno o más de estos elementos estructurales y secuencias de nucleótidos adicionales.

5 La presente invención se refiere además al uso de secuencias de aptámero para controlar a actividad de escisión de los restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención. Un aptámero es una secuencia de nucleótidos que puede unirse por una molécula efectora; una molécula efectora es un ligando que se une al aptámero. Las secuencias de aptámero pueden injertarse en un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión en una localización de manera que la actividad de escisión del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión puede controlarse por la unión de un efector a la secuencia de aptámero. La actividad de escisión del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión puede modularse por la unión de un efector a una secuencia de aptámero que se injerta en el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión en una localización de manera que la actividad de escisión se controla por la unión del efector a la secuencia de aptámero. El injerto, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la incorporación o adición de la secuencia de aptámero en el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión. El injerto puede ser en la secuencia mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión, tal como, por ejemplo, una inserción en las secuencias del tallo I. Alternativamente, el injerto puede estar fuera de la estructura secundaria normal del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de una manera similar a las modificaciones del bucle III. Adicionalmente, un aptámero puede injertarse en el tallo II, tallo III, bucle I, bucle II, bucle III, el núcleo de nucleótido o una combinación de dos o más de los elementos estructurales del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión mencionados anteriormente. La presente invención se refiere a ácidos nucleicos, construcciones (ADN o ARN) que codifican los restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión nuevos y ARN de esquistosoma, descritos e ilustrados en la presente memoria. Las construcciones, tales como construcciones de ADN, pueden usarse solas o en un vector, tal como un plásmido o un vector viral.

25 La presente invención proporciona construcciones de ADN que comprenden: (a) un promotor; (b) ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico y unido de forma operativa al promotor; y (c) ácido nucleico que codifica un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión como se describe en la presente memoria. El ácido nucleico que codifica el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión puede estar en 5' del ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico ó 3' del ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico, y está unido de forma operativa al promotor. El término "promotor" se refiere a un ácido nucleico que, cuando está unido de forma operativa al ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico, es suficiente para el inicio de la transcripción del ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico que se va a expresar. La transcripción del ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico y el ácido nucleico que codifica el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión produce un ARNm que comprende el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión y ARNm que codifica el producto de ácido nucleico. La actividad de escisión del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión controla la escisión del ARNm y, como resultado, la expresión del producto de ácido nucleico; el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión está localizado en el ARNm en una posición de manera que el producto de ácido nucleico no se expresa cuando el ARNm se escinde. Tal y como se usa en la presente memoria, un "producto de ácido nucleico" es una proteína o polipéptido, ADN o ARN distinto de un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención. En una realización particular, el producto de ácido nucleico es una proteína terapéutica.

45 Bajo condiciones apropiadas para la transcripción del ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico y el ácido nucleico que codifica el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión, se produce un ARNm del producto de ácido nucleico y el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión. La auto-escisión del ARNm por el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión previene la expresión del producto de ácido nucleico. El tratamiento de una célula o un individuo, en el que las presentes construcciones de ADN están presentes, con un agente tal como un fármaco (por ejemplo, un antibiótico) u otra molécula o composición, que inhibe (totalmente o parcialmente) la actividad de escisión del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión, resulta en la expresión del producto de ácido nucleico codificado por el ARNm.

50 En una realización específica, la invención proporciona construcciones de ADN que comprenden: (a) un promotor; (b) ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico unido de forma operativa al promotor; y (c) ácido nucleico que codifica un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención que incluye un aptámero injertado en el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión en una localización de manera que la actividad de escisión del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión puede controlarse (es regulable) por la unión de un efector al aptámero. La unión de un efector al aptámero resulta en la modulación (inducción, potenciación, reducción, inhibición (total o parcial) o regulación) de la actividad de escisión del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión. Si la unión del efector al aptámero reduce o inhibe la actividad de escisión del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión, la escisión del ARNm no ocurre o se reduce, y el producto de ácido nucleico se expresa. Su la unión del efector al aptámero no inhibe la actividad de escisión del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión, el ARNm se escinde y como resultado, el producto de ácido nucleico no se expresa (no se produce).

60 En otra realización específica, las construcciones de ADN de la invención comprenden ácido nucleico que codifica dos o más (múltiples) restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención. Los múltiples

restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión pueden comprender los mismos o unos diferentes restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión. Los múltiples restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión codificados por un ácido nucleico se unen 5' a 3'. Por ejemplo, el extremo 3' del ácido nucleico que codifica el primer resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión se une al extremo 5' del ácido nucleico que codifica el siguiente resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión. Opcionalmente, los dos restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión pueden separarse por un conector de ácido nucleico. Generalmente, el ácido nucleico que codifica el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión (uno o más) está en 5' del ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico. Así, el orden de los componentes (5' a 3') en la presente invención puede ser promotor - ácido nucleico que codifica un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión - ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico.

Además del ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico que se va a expresar, los vectores de la presente invención pueden comprender además componentes adicionales, tal como un potenciador, secuencias de direccionamiento, sitios de unión transcripcional, y ácidos nucleicos centrales.

La presente invención se refiere a células huésped que comprenden una construcción de ADN de la presente invención. La construcción comprende: (a) un promotor; (b) ácido nucleico que codifica un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención; y (c) ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico unido de forma operativa al promotor. El ácido nucleico que codifica el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión y el ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico están en 3' del promotor. La transcripción del ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) produce un ARNm que comprende el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión y ARNm que codifica el producto de ácido nucleico. La actividad de escisión del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión controla la escisión del ARNm y, como resultado, la expresión del producto de ácido nucleico. En una realización específica, las células huésped de la invención comprenden un ácido nucleico que codifica un aptámero que se injerta en un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión, como se ha descrito anteriormente. Opcionalmente, las células huésped también pueden comprender un ácido nucleico que codifica dos o más (por ejemplo, múltiples) restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención.

En determinadas realizaciones, la invención se refiere a líneas celulares de empaquetamiento útiles para generar vectores virales y virus recombinantes de la invención. También se refiere a una construcción de dichas líneas celulares y a métodos para usar los vectores virales y virus recombinantes para modular la producción de un producto de ácido nucleico *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. Las líneas celulares útiles para generar vectores virales y virus recombinantes de la invención se producen transfectando las células huésped, tal como células huésped de mamífero, con un vector viral o virus de la invención.

La presente invención se refiere al uso de los restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión descritos en la presente memoria en métodos para modular la expresión de un producto de ácido nucleico en una célula huésped o un individuo. La expresión del producto de ácido nucleico se modula a través del control de la escisión *cis* de un ARNm que codifica el producto de ácido nucleico. Mediante modulación se quiere decir, inducción, potenciación (incremento), reducción, inhibición (total o parcial) o regulación de un proceso. En una realización particular, la modulación de la expresión se refiere a la capacidad de incrementar (potenciar) la expresión del producto de ácido nucleico. En otra realización particular, la modulación de la expresión se refiere a reducir la expresión del producto de ácido nucleico. Así, la modulación puede ser positiva (incremento) o negativa (disminución). Mediante regulación se quiere decir la capacidad para controlar la velocidad y/o grado en el que ocurre un proceso. Por ejemplo, la regulación de la actividad de un resto de ARN de auto-escisión se refiere a controlar la velocidad y grado en el que la actividad del resto de ARN de auto-escisión ocurre. La regulación de la expresión de un ácido nucleico se refiere a controlar la velocidad y grado en el que la expresión del producto de ácido nucleico ocurre.

La presente invención se refiere a un método para modular la expresión de un producto de ácido nucleico en una célula huésped que comprende introducir en la célula huésped una construcción de ADN de la invención que comprende: (a) un promotor; (b) un ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico unido de forma operativa al promotor; y (c) un ácido nucleico que codifica un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión, de manera que la transcripción de los ácidos nucleicos produce una molécula de ARN que comprende el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión y un ARNm que codifica el producto de ácido nucleico, en el que el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión es capaz de escindir el ARN intramolecularmente. La expresión en células según la presente invención se modula a través del control de la escisión de un ARNm que codifica el producto de ácido nucleico. La escisión del ARNm se controla a través de la actividad de un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión, que está localizado en el ARNm en una posición de manera que el producto de ácido nucleico no se expresa cuando el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión se expresa. Bajo condiciones que permiten la expresión del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión, el ARNm se escinde y, como resultado, el producto de ácido nucleico codificado no se produce. En este método, la célula huésped que comprende la construcción de ADN se cultiva en presencia de un agente, tal como un fármaco (por ejemplo, antibiótico) u otra molécula o composición, que inhibe o reduce la actividad de escisión del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de manera que el producto de ácido nucleico codificado por el ARNm se expresa. Las construcciones de ADN usadas en este método pueden comprender además ácido nucleico

que codifica un aptámero que está en una posición de manera que la actividad de escisión del resto de ARN de esquistosoma de auto-escisión es regulable por la unión de un efector al aptámero y/o ácido nucleico que codifica múltiples restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión como se describe en la presente memoria.

5 La presente invención también se refiere a un método para expresar o modular la expresión de un producto de ácido nucleico en un individuo (por ejemplo, un ser humano u otro mamífero o vertebrado). El método comprende modular la expresión de un producto de ácido nucleico de una construcción de ADN de la invención que está presente en (contenida en) células en el individuo. La construcción de ADN comprende ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico y ácido nucleico que codifica un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención cuya actividad puede, a su vez, modularse por un agente cuando el producto de ácido nucleico se quiere expresar. La transcripción del ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico y el ácido nucleico que codifica el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión produce un ARNm que comprende el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión y ARNm que codifica el producto de ácido nucleico.

10 La expresión de un producto de ácido nucleico se efectúa mediante la administración de un antibiótico a un individuo, algunas de cuyas células contienen una construcción de ADN de la presente invención. La construcción de ADN comprende: (a) un promotor; (b) ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico unido de forma operativa al promotor; y (c) ácido nucleico que codifica un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención. La transcripción del ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) produce ARNm que comprende el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión y ARNm que codifica el producto de ácido nucleico. Como resultado, la actividad del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión codificado se inhibe (parcialmente o totalmente), con el resultado de que el producto de ácido nucleico de interés se expresa en el individuo. La construcción de ADN puede introducirse en células en el individuo *in vivo* (por ejemplo, introduciendo la construcción de ADN) en un tejido o fluido corporal del individuo) o *ex vivo* (por ejemplo, introduciendo la construcción de ADN en células obtenidas del individuo o de otro (diferente) individuo o fuente y después introduciendo las células resultantes en el individuo). En cualquier caso, la administración de un antibiótico resulta en la inhibición de la actividad del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión y, como resultado, el ARNm que codifica el producto de ácido nucleico de interés no se escinde y el producto de ácido nucleico de interés se expresa.

15 El método puede llevarse a cabo mediante: (a) la obtención de células de un individuo y mantenimiento de las células bajo condiciones apropiadas para el crecimiento celular y división celular; (b) la introducción en las células de una construcción de ADN de la invención; (c) el retorno de las células producidas en la etapa (b) al individuo; y (d) la administración al individuo de un agente que inhibe la escisión del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión. En una realización particular, la construcción de ADN de la invención comprende: (a) un promotor; (b) ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico que se va a expresar, unido de forma operativa al promotor; y (c) ácido nucleico que codifica un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención. El ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico que se va a expresar y el ácido nucleico que codifica el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión están en 3' del promotor. La transcripción del ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico y el ácido nucleico que codifica el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión produce un ARNm que comprende el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión y ARNm que codifica el producto de ácido nucleico.

20 En esta realización particular del método para expresar un producto de ácido nucleico en un individuo, el agente es, por ejemplo, un antibiótico.

25 En una realización, la presente invención se refiere a un método para regular la expresión de un gen endógeno (un gen residente en una célula como fue obtenida la célula) para producir un producto de ácido nucleico y composiciones útiles en el método. El gen endógeno puede ser uno que se expresa ("activado") en la célula o uno que normalmente no se expresa ("inactivado") en la célula, pero cuya expresión es o se ha activado. En esta realización, una construcción de ADN que codifica un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención se introduce en el ADN genómico de células en una posición tal que, en el ARNm producido por las células, el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión está en una localización que resulta en el control de la expresión del producto de ácido nucleico codificado. En ausencia de un agente que inhibe la expresión del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión, la escisión ocurre y el producto de ácido nucleico no se expresa. En presencia de dicho agente, la actividad de escisión se inhibe y el producto de ácido nucleico se expresa. En una realización, el ADN que codifica un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención puede introducirse solo o en un vector, en ADN genómico entre el promotor unido de forma operativa a (que controla la expresión de) el gen endógeno que codifica el producto de ácido nucleico, de manera tal que el gen endógeno permanece unido de forma operativa al promotor. En una realización alternativa, el ADN que codifica un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión puede introducirse solo o en un vector, en ADN genómico en 3' del gen endógeno que codifica el producto de ácido nucleico. El promotor que está unido de forma operativa al gen endógeno que se va a expresar puede ser el promotor natural (endógeno) para el gen o puede ser un promotor exógeno introducido en ADN genómico. Las células resultantes pueden usarse, como se describe en la presente memoria, para modular la producción del producto de ácido nucleico en un individuo.

En determinadas realizaciones, la expresión de un producto de ácido nucleico se efectúa mediante la administración de un oligonucleótido antisentido de un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión a una célula o un individuo. Algunas de estas células contienen una construcción de ADN de la presente invención, en el que la construcción de ADN comprende: (a) un promotor; (b) ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico unido de forma operativa al promotor; y (c) ácido nucleico que codifica un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención. La transcripción del ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) produce ARNm que comprende el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión y ARNm que codifica el producto de ácido nucleico. Como resultado, la actividad del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión codificado se inhibe (parcialmente o totalmente) por el oligonucleótido antisentido, con el resultado de que el producto de ácido nucleico de interés se expresa en la célula o individuo. Preferiblemente, el oligonucleótido antisentido se empareja por bases con una región del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión como se representa en SEQ ID NO: 67. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido modificado seleccionado del grupo que consiste en: morfolino, ARN fosforotioato, ARN 2'-O-metilo, y ARN fosforotioato 2'-O-metoxietilo.

En una realización particular, la presente invención se refiere a un método para inducir específicamente la expresión de un gen diana en una célula, que comprende poner en contacto la célula con un oligonucleótido antisentido que inhibe específicamente un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión, en el que el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión está presente en una molécula de ARN que codifica el producto génico diana. La célula que comprende la molécula de ARN se cultiva bajo condiciones apropiadas para que el oligonucleótido antisentido inhiba la escisión de la molécula de ARN por el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión. El método se basa, en parte, en la capacidad de oligonucleótidos específicos de discriminar diferentes restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión. Opcionalmente, el método de la invención puede usarse para la generación de múltiples sistemas independientes para la regulación génica.

De forma similar, la presente invención se refiere a un método para modular específicamente (inducir o inhibir) la expresión de un gen diana en una célula, que comprende poner en contacto la célula con un efector que se une específicamente a un aptámero, en el que el aptámero se prepara por ingeniería para estar presente en una molécula de ARN que codifica el producto génico diana y un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión. La célula que comprende la molécula de ARN se cultiva bajo condiciones apropiadas para la interacción entre el efector y el aptámero de manera que la interacción modula la escisión de la molécula de ARN por el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión como se ha descrito anteriormente. Este método se basa, en parte, en la capacidad de efectores específicos de discriminar entre diferentes aptámeros. Opcionalmente, el método de la invención puede usarse para la generación de múltiples sistemas independientes para la regulación génica.

La presente invención también proporciona oligonucleótidos antisentido modificados de un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión. Preferiblemente, los oligonucleótidos antisentido de la invención se emparejan por bases con una región diana del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión como se representa en SEQ ID NO: 67. Los ejemplos de los oligonucleótidos antisentido modificados incluyen, pero no están limitados a, morfolino, ARN fosforotioato, ARN 2'-O-metilo, y ARN fosforotioato 2'-O-metoxietilo.

La presente invención se refiere a un método para cribar un agente que inhibe la actividad catalítica de un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la presente invención que comprende: (a) introducir en células huésped una construcción de ADN de la invención que comprende: (1) un promotor, (2) ácido nucleico que codifica un informador que está unido de forma operativa al promotor y (3) ácido nucleico que codifica un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención, en el que el ácido nucleico de (2) y el ácido nucleico de (3) están en 3' del promotor, en el que la construcción de ADN se introduce en las células huésped en condiciones apropiadas para la expresión del ácido nucleico que codifica el informador y el ácido nucleico que codifica el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión; (b) poner en contacto células huésped con un agente que se va a evaluar para su capacidad de inhibir la actividad catalítica del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión bajo condiciones que resultan en la introducción del agente en las células; y (c) evaluar la actividad del informador en las células huésped. Si la actividad del informador detectada en presencia del agente es mayor que la actividad del informador detectada en ausencia del agente, el agente se identifica como uno que inhibe la actividad catalítica de un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión.

La presente invención también se refiere a un método para cribar un efector que se une a un aptámero (o secuencia de ARN) e inhibe la actividad catalítica de un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención. En este método, se introduce en las células huésped una construcción de ADN de la invención que comprende: (1) un promotor, (2) ácido nucleico que codifica un informador unido de forma operativa al promotor y (3) ácido nucleico que codifica un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención que incluye un aptámero localizado en una posición de manera que la actividad de escisión del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión es regulable por la unión de un efector al aptámero, en el que el ácido nucleico de (2) y el ácido nucleico de (3) están en 3' del promotor, y la transcripción del ácido nucleico de (2) y el ácido nucleico de (3) produce un ARNm que comprende el aptámero-resto de ARN de esquistosoma de auto-escisión (o secuencia de ARN-resto de ARN de esquistosoma de auto-escisión) y ARNm que codifica el informador. Las células huésped se ponen en contacto con un agente que se va a evaluar para su capacidad de unirse al aptámero (o secuencia de ARN) bajo condiciones apropiadas para la expresión del informador y el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión, y la actividad del informador se ensaya en las células huésped. Si la actividad del informador

detectada en presencia del agente es mayor que la actividad del informador detectada en ausencia del agente, el agente se identifica como un efector que puede unirse al aptámero (o secuencia de ARN) e inhibir la actividad catalítica de un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión.

La presente invención también se refiere a un método para producir un animal no humano transgénico usando el resto de ARN de esquistosoma de auto-escisión. En una realización, el animal transgénico se produce introduciendo una construcción de ADN de la invención en una célula germinal de un animal no humano o la célula germinal de su ancestro, en el que la construcción de ADN comprende: (a) un promotor, (b) ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico unido de forma operativa al promotor y (c) ácido nucleico que codifica un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención. El ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) están en 3' del promotor, y la transcripción del ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) produce un ARNm que comprende el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión y ARNm que codifica el producto de ácido nucleico.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un kit para regular a expresión génica. Por ejemplo, el kit comprende un ácido nucleico que comprende: (a) una secuencia mutante de ribozima de esquistosoma; y (b) un sitio de clonación para la introducción de una secuencia de nucleótidos diana que se va a transcribir unida de forma operativa a la secuencia mutante de ribozima de esquistosoma. Opcionalmente, el kit puede comprender además un inhibidor del mutante de ribozima de esquistosoma. Por ejemplo, el mutante de ribozima de esquistosoma comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NOs: 1-63. El inhibidor del kit incluye, pero no está limitado a, toyocamicina, 8-azaadenosina, sangivamicina, tubercidina, tubercidina-monofosfato cíclico, tubercidina-monofosfato, tubercidina-trifosfato, nebularina, nucleósido tricíclico, 5-fluorouridina, 5-bromouridina, 5-fluorouracilo, Syto-83, bromuro de homidio, y naranja de acridina.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un método para determinar el nivel de un inhibidor de un mutante de ribozima de esquistosoma en una célula. En este método, se introduce en una célula una construcción de ADN que comprende: (1) un promotor; (2) un ácido nucleico que codifica un informador; y (3) un ácido nucleico que codifica un mutante de ribozima de esquistosoma, en el que el ácido nucleico de (2) y el ácido nucleico de (3) están en 3' del promotor y unido de forma operativa a dicho promotor, bajo condiciones que resultan en la inhibición del mutante de ribozima y expresión del informador. La actividad del informador se ensaya, en el que el nivel de dicho inhibidor en la célula se identifica comparando la actividad del informador con un control apropiado. Preferiblemente, el inhibidor es 5-fluorouracilo ó 5-fluorouridina. En determinados casos, el informador se selecciona de  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa,  $\beta$ -glucosidasa, cloranfenicol acetil transferasa (CAT), proteína fluorescente verde, y luciferasa. Opcionalmente, la célula es una célula de cáncer.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un método para determinar el nivel de un inhibidor de un mutante de ribozima de esquistosoma en una muestra biológica. En este método, una célula se pone en contacto con una muestra biológica, en el que la célula se prepara por ingeniería para expresar una construcción de ADN que comprende: (1) un promotor; (2) un ácido nucleico que codifica un informador; y (3) un ácido nucleico que codifica un mutante de ribozima de esquistosoma, en el que el ácido nucleico de (2) y el ácido nucleico de (3) están en 3' del promotor y unido de forma operativa, a dicho promotor, bajo condiciones que resultan en la inhibición del mutante de ribozima y expresión del informador. La actividad del informador se ensaya, en el que el nivel de dicho inhibidor en la muestra biológica se identifica comparando la actividad del informador con un control apropiado.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un método para inhibir la actividad de un ARN catalítico en una célula, que comprende poner en contacto una célula con un inhibidor de un mutante de ribozima de esquistosoma. Preferiblemente, la célula se ha infectado o está en riesgo de tener una infección con un virus o un microorganismo patogénico. Por ejemplo, el inhibidor se selecciona de toyocamicina, 8-azaadenosina, sangivamicina, tubercidina, tubercidina-monofosfato cíclico, tubercidina-monofosfato, tubercidina-trifosfato, nebularina, nucleósido tricíclico, 5-fluorouridina, 5-bromouridina, 5-fluorouracilo, Syto-83, bromuro de homidio, y naranja de acridina. En determinados casos, el inhibidor es un oligonucleótido antisentido, incluyendo un oligonucleótido antisentido modificado (por ejemplo, morfolino, ARN fosforotioato, ARN 2'-O-metilo, o ARN fosforotioato 2'-O-metoxietilo).

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un método para inhibir la infección por un virus o un microorganismo patogénico en una célula, que comprende poner en contacto una célula con un inhibidor de un mutante de ribozima de esquistosoma. La infección puede estar causada por un virus (por ejemplo, un virus de inmunodeficiencia humana, un virus de herpes, un virus de hepatitis, o un papilomavirus humano) o un microorganismo patogénico (por ejemplo, *Notophthalmus virdescens*, *Ambystoma talpoideum*, *Amphiuma tridactylum*, y *Schistosoma mansoni*). La célula puede ser una célula animal (por ejemplo, una célula de mamífero) o una célula de planta (por ejemplo, tabaco).

## Descripción breve de los dibujos

Las Figuras 1a-1g muestran la estrategia para controlar la expresión génica mediante la modulación de la auto-escisión de ARN y optimización de la actividad de auto-escisión de Sm1 rz de Esquistosoma, (a) Cuando un rz de cabeza de martillo que actúa en cis se incluye en el ARNm, la auto-escisión da lugar a la destrucción del ARNm y la ausencia de expresión génica. Sin embargo, un mutante inactivo o la administración de inhibidores específicos de la

rz da lugar a la generación de ARNm intactos y expresión de proteína. (b) El vector de expresión del gen informador pMD usado para el ensayo de transfección, y las posiciones en las que se pusieron rz. El sitio Cap en el inicio del ARNm; Un sitio en 5' del intrón; B, C, y D sitio en el intrón; E sitio inmediatamente en 5' del inicio de la traducción; F y G sitios en la región no traducida 3'. (c) a (g): optimización de la actividad de Sm1 de Esquistosoma (SEQ ID NOs: 1-12). (c) y (d), rz insertada en la posición A del vector pMD; (e) a (g) en la posición E del vector. Los mutantes inactivos correspondientes contenían una sustitución A14 a G. El nombre de rz se muestra a la izquierda; la actividad de escisión a la derecha. (c) Resto Pst3 de grillo. La numeración de los nucleótidos sigue la nomenclatura de Hertel et al., 1992. (d) Resto SM1 de Esquistosoma. El Sm1 original carecía del bucle III y no presentaba actividad en células. Los nucleótidos representados en color reflejan los cambios hechos a Sm1. (e) Los cambios en el tallo I de N79 cerca del núcleo o cerca del sitio de inserción de restricción potenciaron más la actividad. La línea negra identifica la secuencia diana de los oligonucleótidos morfolino antisentido (SEQ ID NO: 67). (f) El acortamiento del tallo I redujo de forma importante la actividad de escisión de rz, (g) Los cambios de nucleótido único en el bucle I de la rz N107 disminuyeron su actividad dramáticamente. La rz N107 es una variante de N79 en la que dos 'AUG' se reemplazaron por GUG y ACG para eliminar los codones de inicio potenciales. Los signos ± indican la desviación estándar de la media de al menos cuatro medidas independientes.

Las Figuras 2a-2b muestran que la auto-escisión eficiente puede ocurrir en diferentes células, con diferentes vectores, y con secuencias de rz posicionadas en diferentes localizaciones. (a) N79 funcionó eficientemente en una variedad de tipos de células. Los números son las medidas de β-gal expresada. (b) N79 funcionó eficientemente en algunas, pero no todas, las posiciones en el vector. Los números son 'veces de disminución' en la expresión de β-gal (rz funcional frente a inactiva). Los signos ± indican la desviación estándar de la media de al menos cuatro medidas independientes.

Las Figuras 3a-3c muestran la inducción de la expresión génica en células cultivadas mediante la inhibición de la auto-escisión de rz. (a) Efecto de oligonucleótido morfolino en rz N79 en ensayo de transfección transitorio. La inducción se midió por 'veces de incremento' en la expresión de β-gal con frente a sin aplicación de morfolino. El nivel de inducción también se muestra como un porcentaje respecto al nivel de expresión de rz inactiva. La diana para el oligonucleótido se muestra en la Fig. 1e. (b) Inducción de la expresión de luciferasa por toyocamicina en una línea celular estable que porta una construcción de expresión que contiene una doble rz N79. Las células se trataron con toyocamicina durante 24 horas a la dosificación de 0, 0,5, 1, y 1,5 μM (se observaron efectos tóxicos a concentraciones mayores de 1,5 μM). Las medidas cuantitativas de actividad luciferasa revelaron emisión de 1.555, 66.774, 242.546, 377.655 fotones por segundo por 1.000 células respectivamente, comparado con una emisión de fondo de 121 de células que no portan el gen de luciferasa. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos cuatro medidas independientes. (c) Inducción por toyocamicina a nivel de ARN como se revela por análisis de transferencia northern. Las condiciones experimentales fueron similares a las de (b). El ARN se purificó del núcleo 'N' o el citoplasma 'C' después de 24 horas de tratamiento.

La Figura 4 muestra el control efectivo de la expresión génica *in vivo* usando un sistema de regulación génica basado en rz-. El panel superior muestra el animal al que se inyectó en la retina AAV que porta doble inactivo N79 y se trató con toyocamicina. El panel medio muestra el animal al que se inyectó en la retina AAV que porta doble funcional N79 y se trató con adenosina. El panel inferior muestra lo mismo que el panel medio pero tratado con toyocamicina. Se observó una fuerte inducción en la expresión de luciferasa en el día 2 en el panel inferior. También se inyectó a los animales en los músculos isquiotibiales de la extremidad posterior AAV que porta doble inactivo N79 como control interno. La inyección de AAV se hizo 3 semanas antes del primer día de formación de imágenes (día 0). Se implantaron gránulos con liberación de fármaco subcutáneamente en el cuello dorsal inmediatamente después de la primera formación de imágenes, y liberaron el fármaco durante 7 días. El gránulo de toyocamicina contiene 10 μg de fármaco; el gránulo de adenosina 50 μg.

Las Figuras 5A-5F muestran secuencias de algunos restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión (SEQ ID NOs: 13-46), localizaciones de estas modificaciones de nucleótidos, y sus actividades de auto-escisión en células de mamíferos. Los cambios en la actividad de ribozima resultante se midieron monitorizando las veces de diferencia en la actividad del informador beta-galactosidasa.

La Figura 6 es un diagrama que ilustra la secuencia de nucleótidos parcial de un resto de ARN de esquistosoma de auto-escisión y sitios para modificación del bucle III y núcleo; SEQ ID NO: 64.

La Figura 7 es un diagrama que ilustra la secuencia de nucleótidos parcial de un resto de ARN de esquistosoma de auto-escisión con un bucle III de cuatro nucleótidos y un sitio para la modificación de núcleo; SEQ ID NO: 65.

La Figura 8 muestra la secuencia de nucleótidos de un vector ejemplar denominado HDM-nLacZ; SEQ ID NO: 66.

Las Figuras 9A-9B muestran que 5'-FUridina (A) y 5'-FUracilo (B) indujeron la expresión génica mediante la inhibición de la auto-escisión de rz de una manera dependiente de la dosis.

La Figura 10 muestra las estructuras de cuatro ribozimas pequeñas: (a) de cabeza de martillo; (b) horquilla; (c) virus de hepatitis delta; y (d) ribozimas de *Neurospora* VS. Las ribozimas de cabeza de martillo (a) están compuestas por

tres hélices de tallo designadas I, II, y III. La región núcleo comprende nucleótidos no emparejados. Las estructuras de bucle pueden estar presentes en las ramificaciones de los tallos I, II, y III.

La Figura 11 muestra la estructura secundaria y la secuencia de nucleótidos de ribozima de grillo.

La Figura 12 muestra la estructura secundaria y la secuencia de nucleótidos de ribozima de TRSV.

- 5 La Figura 13 muestra la estructura secundaria y la secuencia de nucleótidos de la ribozima de esquistosoma natural (tipo salvaje) y se indica la localización de las modificaciones iniciales. Se indican los tallos I, II, y III.

### Descripción detallada de la invención

10 En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones y métodos para controlar la expresión génica con un sistema basado en ribozima. El término "ribozima" tal y como se usa en la presente memoria, incluye ribozimas naturales (tipo salvaje) y ribozimas modificadas (también referidas como mutantes o variantes). En particular, la invención se refiere a restos de ribozima de auto-escisión nuevos (por ejemplo, ribozimas de esquistosoma), ácidos nucleicos que codifican al menos un resto de ribozima de auto-escisión, reguladores (por ejemplo, inhibidores) de los restos de ribozima de auto-escisión, y métodos que implican usos de los restos de ribozima y sus reguladores para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas. Aunque la solicitud discute en su mayor parte composiciones y métodos derivados de una ribozima particular (ribozima de esquistosoma), un experto en la técnica reconocerá fácilmente que pueden derivarse composiciones y métodos similares de cualquier otra ribozima que funciona en células de mamíferos.

15 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a ribozimas de auto-escisión que son funcionales en células de mamíferos. El término "ribozima de auto-escisión funcional" se refiere a una ribozima de auto-escisión que escinde eficientemente una molécula de ARN en la que la ribozima está incluida y da lugar a al menos 90% (preferiblemente 95%, 98%, 99% ó 100%) de reducción en la molécula de ARN respecto a una ribozima inactiva. Por ejemplo, la actividad de la ribozima de auto-escisión puede ensayarse por los métodos descritos en los ejemplos de trabajo más adelante.

20 Se describen ejemplos de ribozima de cabeza de martillo (tipo salvaje o mutantes) seleccionados de ARN+ circular pequeño de cereza (Scc+), ARN circular pequeño de cereza (Scc-), virusoide+ de mancha transitoria de alfalfa (sLTSV+), virusoide- de mancha transitoria de alfalfa (sLTSV-), ARN+ satélite de virus de mancha anillada de tabaco (STRSV+), virus de mosaico de Arabis (sArMV), ARN satélite de virus de mota amarilla de achicoria (sCYMV), ARN-satélite de virus de cebada amarilla enana (sBYDV-), ARN+ satélite de virus de cebada amarilla enana (sBYDV+), ARN+ de virus de mosaico latente de melocotón (PLMVd+), ARN- de virus de mosaico latente de melocotón (PLMVd-), viroide+ de mota clorótica de crisantemo (CChMVd+), viroide- de mota clorótica de crisantemo (CChMVd-), virusoide de mota de clavel subterráneo (vSCMoV), y virusoide de mota aterciopelada de tabaco (vVTMoV).

25 La ribozima de la invención es una ribozima de cabeza de martillo (tipo salvaje o mutantes) seleccionada de ARN satélite de *Notophthalmus virdescens* (tritón), *Ambystoma talpoideum* (Am. ta.), *Amphiuma tridactylum* (Am. tr.), ribozima de cabeza de martillo de *Schistosoma mansoni* (Schistozima), ribozima de cabeza de martillo de grillo *D. baccelli* (cricketzima A), ribozima de cabeza de martillo de grillo *D. schiavazzii* (cricketzima B), y viroide+ de mancha de sol de aguacate (ASBV+). Un ejemplo específico de la secuencia de ribozima es la de grillo de cueva *Dolichopoda* como se ilustra en la Figura 1C (SEQ ID NO: 1).

30 Como un ejemplo adicional, se describen otras ribozimas de auto-escisión, tal como una ribozima de virus de hepatitis delta (HDV), una ribozima de horquilla, y una ribozima de satélite Varkud de *Neurospora* (VS) (véase, por ejemplo, la Figura 10). Como las ribozimas de cabeza de martillo, estas tres ribozimas de auto-escisión se encuentran en genomas de ARN virales, virusoides, o satélites, y procesan los productos de la replicación en círculo rodante en cadenas de longitud de genoma (Doherty et al., 2001, Annu Rev Biophys Biomol Struct. 30:457-75; Branch et al., 1984, Science 223:45055).

35 En particular, la invención se refiere a restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión nuevos, ácidos nucleicos que codifican al menos un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión, reguladores (por ejemplo, inhibidores) de los restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión, y métodos que implican usos del resto mutante de ARN de esquistosoma y sus reguladores para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

### Restos mutantes de ARN de auto-escisión

40 Los restos mutantes de ARN de auto-escisión (por ejemplo, restos mutantes de esquistosoma) también se refieren como mutantes de ribozima o restos de ribozima modificados). Estas ribozimas modificadas pueden usarse para modular la expresión de un producto de ácido nucleico deseado en células. La expresión en células según la invención se modula a través del control de la actividad de un resto mutante de ARN de auto-escisión de la invención. En particular, la expresión de un producto de ácido nucleico se modula por la actividad de un resto mutante de ARN de auto-escisión que está localizado en el ARNm en una posición de manera que el producto de ácido nucleico deseado no se expresa cuando el resto mutante es activo. Bajo condiciones que son apropiadas para

la expresión del resto mutante de ARN de auto-escisión, el ARNm se escinde y, como resultado, el producto de ácido nucleico deseado codificado por el ARNm no se produce (Figura 1A). La administración a las células de un agente tal como un fármaco u otra molécula o composición, que inhibe o reduce la actividad de escisión del resto mutante de ARN de auto-escisión, previene la escisión del ARNm y, por lo tanto, el producto de ácido nucleico se expresa (Figura 1A).

Las ribozimas son restos estructurales de ARN de aproximadamente 40-60 nucleótidos que pueden auto-escindirse de una manera específica de secuencia. El término "ribozima" se refiere a una secuencia de ARN que hibrida con una secuencia complementaria en un ARN sustrato y escinde el ARN sustrato de una manera específica de secuencia en un sitio de escisión del sustrato. Típicamente, una ribozima contiene una región catalítica flanqueada por dos regiones de unión. Las regiones de unión de la ribozima hibridan con el ARN sustrato, mientras la región catalítica escinde el ARN sustrato en un sitio de escisión del sustrato para rendir un producto de ARN escindido. La secuencia de nucleótidos de las regiones de unión de la ribozima puede ser completamente complementaria o parcialmente complementaria a la secuencia del ARN sustrato con la que se unen las regiones de unión de la ribozima. Generalmente, las ribozimas están incluidas en ADN satélite altamente repetitivo y se han identificado en virus de plantas, tritones, grillos de cueva, y esquistosomas.

Los esquistosomas son una familia de trematodos sanguíneos parasitarios que infectan a los seres humanos. Recientemente, se encontró que varios miembros de la familia de *Esquistosoma* codifican ribozimas de cabeza de martillo (Ferbeyre *et al.*, *Mol. Cell Bio.* 18:3880-3888 (1998)). Las ribozimas de cabeza de martillo son una de las cuatro clases conocidas de restos de ARN de auto-escisión y el término se refiere a la estructura secundaria de esta clase de ribozimas. La estructura secundaria de cabeza de martillo está compuesta por tres hélices, referidas como tallo I, tallo II y tallo III, unidas en un núcleo central de 11-12 nucleótidos monocatenarios que son necesarios y suficientes para la reacción de auto-escisión (Uhlenbeck, *Nature*, 328:596-600 (1987); y Foster y Symons, *Cell*, 50:9-16 (1987)). Los estudios de mutagénesis dirigida a sitio sistemática han determinado que la mayor parte de los nucleótidos en el núcleo conservado no pueden experimentar mutación sin una pérdida significativa de actividad catalítica (Ruffner *et al.*, *Biochemistry*, 29: 10695-10702 (1990)). Esta observación se usó para generar restos de ARN de auto-escisión inactivos usados en la presente memoria como controles negativos en ensayos de actividad de ribozima.

Las ribozimas pueden tener elementos estructurales adicionales tal como bucles, que se designan por el tallo del que se ramifican. Por ejemplo, las ribozimas de esquistosoma tienen un bucle de seis nucleótidos en el tallo II (bucle II), como se ilustra en la Figura 1c. Las ribozimas de esquistosoma naturales (tipo salvaje) incluyen tallos I-III, bucles I-II, pero no bucle III. Por bucle II se quiere decir un bucle en el tallo II. Por bucle III se quiere decir un bucle en el tallo III. Otros bucles se identifican de forma similar en la presente memoria por esta convención (por ejemplo, bucle I). La nomenclatura estándar para la posición de nucleótidos en las ribozimas de cabeza de martillo se usa en la presente memoria (Clouet-d'Orval y Uhlenbeck, *Biochemistry*, 36:9087-9092 (1997)). En determinadas realizaciones, la presente invención contempla secuencias que están fuera de la región consenso o conservada de las ribozimas. Opcionalmente, las secuencias fuera de la estructura de ribozima de cabeza de martillo canónica pueden incorporarse en la estructura de la ribozima. Las composiciones resultantes son ejemplos de restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención.

Como se describe en la presente memoria, la modificación o alteración de la secuencia de nucleótidos de ribozimas naturales (por ejemplo, ribozima de esquistosoma) puede incrementar o disminuir su actividad catalítica. Tal y como se usa en la presente memoria, actividad catalítica se refiere a la capacidad de la ribozima de escindir autocatalíticamente su ARN.

Los restos mutantes de ARN de auto-escisión (por ejemplo, mutantes de ribozima de esquistosoma) y métodos descritos en la presente invención son particularmente útiles en el control exógeno de la expresión génica. La presente invención hace posible el modular la expresión de un producto de ácido nucleico sin la necesidad de usar elementos de control transcripcional especiales o transactivadores quiméricos. Así, la presente invención tiene varias ventajas claras sobre las metodologías disponibles previamente y tiene aplicaciones amplias en dichos campos como la producción de proteínas, terapia génica, y biología de desarrollo. Además, el elemento genético esencial para la regulación génica es muy pequeño en tamaño y no codifica ningún producto génico. De acuerdo con esto, es improbable que la introducción del elemento en las células resultara en ninguna toxicidad, y debe ser posible incorporar las secuencias necesarias para obtener una expresión regulada en muchos tipos de vectores diferentes.

Un beneficio adicional de los métodos descritos en la presente memoria para modular la expresión de un producto de ácido nucleico es que la regulación génica no es sensible a la posición cromosómica, ya que la modulación no depende del control del inicio de la transcripción. Además, a diferencia de métodos existentes para controlar la expresión de un producto de ácido nucleico, que requieren el uso de promotores híbridos específicos, es posible modular la expresión en el contexto de elementos transcripcionales normales específicos del tipo de célula o específicos del estadio de desarrollo de cualquier gen o vector. De hecho, mediante la incorporación del elemento genético esencial para la regulación génica en una unidad transcripcional, es incluso posible proporcionar regulación génica en el contexto de la estructura de ARNm normal usada para la expresión génica (por ejemplo, una estructura desprovista de cualesquiera elementos reguladores exógenos). Estas características pueden demostrar que son

particularmente importantes para experimentos transgénicos y de inactivación génica en animales diseñados para evaluar el papel de un producto génico específico en diferentes estadios de desarrollo, en el que el papel esencial de un producto génico en el desarrollo embrionario puede descartar la capacidad para determinar el papel del producto génico en un estadio posterior del desarrollo.

5 En determinados aspectos, la presente invención se refiere a restos mutantes de ARN de auto-escisión (por ejemplo, mutantes de ribozima de esquistosomas) que comprenden modificaciones que modulan o alteran su actividad catalítica. Las modificaciones pueden modular bien positivamente (incrementar) o negativamente (disminuir) la actividad catalítica del resto de ARN de auto-escisión. En una realización particular, las modificaciones pueden modular, bien positivamente o negativamente, la capacidad y/o velocidad del resto de ARN de auto-escisión para la auto-escisión. Las modificaciones también pueden no tener un efecto mensurable en la actividad del resto de ARN de auto-escisión. Por "modificación" se quiere decir una modificación (por ejemplo, alteración o cambio) de los elementos estructurales de ribozima naturales o la adición de otros elementos estructurales no encontrados en la ribozima natural. El término "modificación" se pretende que incluya adiciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos a la secuencia del resto de ARN de auto-escisión o secuencias adyacentes que comprenden el resto de ARN de auto-escisión. Las modificaciones incluyen la adición (por ejemplo, por injerto) de estructuras de tallo y/o bucle a una ribozima natural y la modificación de estructuras de tallo y/o bucle de una ribozima natural. Las modificaciones también incluyen la adición de uno o más (múltiples) aptámeros a un resto de ARN de auto-escisión y la adición de otras características estructurales a un resto de ARN de auto-escisión, tal como horquillas. Estas modificaciones pueden usarse separadamente o en combinación con una o más otras modificaciones y no se pretende que sean limitantes de ninguna manera.

En una realización, la presente invención se refiere a un resto de ARN de esquistosoma de auto-escisión modificado para incluir un bucle en el tallo III. Un "bucle", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una estructura secundaria en una secuencia de ARN en la que una secuencia de ARN monocatenaria está flanqueada por secuencias de ARN que son capaces de emparejarse entre sí para formar una estructura de "tallo". Un bucle comprende al menos tres nucleótidos, y preferiblemente de aproximadamente 3-40 nucleótidos. Un "bucle" puede incluir nucleótidos que pueden emparejarse por bases y resultar en estructuras no de bucle. Por ejemplo, un bucle puede incluir nucleótidos que pueden emparejarse por bases y opcionalmente elongar el tallo del que se ramifica. Por "ramificaciones" se quiere decir que la secuencia de nucleótidos de la modificación empieza donde el tallo finalizaba originalmente. Por "emparejamiento por bases" se quiere decir la formulación de enlace(s) de hidrógeno entre dos secuencias de ácido nucleico bien por Watson-Crick tradicional u otros tipos no tradicionales (por ejemplo, tipo Hoogsteen) de interacciones. Un resto de ARN de esquistosoma de auto-escisión incluyendo un bucle en el tallo III es un ejemplo de un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención. Preferiblemente, la actividad catalítica de dicho resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión que comprende un bucle en el tallo III es mayor que la actividad catalítica del resto de ARN de esquistosoma de auto-escisión natural correspondiente.

En una realización particular, un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención comprende un bucle III de cuatro nucleótidos. En una realización particular, el bucle comprende 5'-UUCG-3'. Un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención ejemplar (N99) se ilustra en la Figura 1e. La presente invención también proporciona otros restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión y sus secuencias en la Figura 5 (SEQ ID NOs: 13-63).

En otra realización, un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención comprende un bucle III de seis u ocho nucleótidos que también elonga el tallo III. Los ejemplos de restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión que comprenden un bucle III de seis nucleótidos se ilustran en la Figura 5 (por ejemplo, N27 y N53). Los ejemplos de restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión que comprenden un bucle III de ocho nucleótidos también se ilustran en la Figura 5 (por ejemplo, N73, N79, N99, y N117).

Los restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención también pueden incluir sustituciones en la posición 5, 7 y/o 14 (por ejemplo, C→U del núcleo, como se ilustra en las Figuras 1 y 5). En una realización particular, un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención comprende un bucle III y una sustitución en el núcleo conservado. En una realización preferida, el bucle III comprende 5'-UUCG-3' y un U en la posición 7 del núcleo, como se ilustra en las Figuras 1 y 5 (por ejemplo, N53, N73, N79, N99, y N117). En otra realización, un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención comprende una adición de seis nucleótidos al final del tallo III y un U en la posición 7 del núcleo, como se ilustra en las Figuras 1 y 5.

En determinadas realizaciones, la presente invención también se refiere a otros restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión ilustrados en la Figura 5 (SEQ ID NOs: 13-63).

55 El término "sustitución", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a uno o más de uno (uno o múltiples) cambios de nucleótidos en el resto de ARN de auto-escisión natural. El término "resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión" se refiere a un resto de ARN de esquistosoma de auto-escisión, que comprende al menos una alteración de nucleótido comparado con una ribozima de esquistosoma natural (tipo salvaje) (por ejemplo, sm1) como se representa en la Figura 1d (Ferbeyre *et al*, Mol. Cell Bio., 18:3880-3888 (1998)). Los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para identificar cualesquiera restos mutantes de ribozima

de auto-escisión (por ejemplo, restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión con propiedades catalíticas alteradas). Los métodos para ensayar la actividad catalítica son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden incubarse restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión marcados bajo condiciones apropiadas para la escisión, fraccionarse por electroforesis en gel y cuantificarse el grado de escisión por autorradiografía. Los métodos para cuantificar la actividad catalítica de los restos mutantes de ARN de esquistosoma de auto-escisión de la invención son conocidos en la técnica e incluyen el uso de un gen informador, tal como, por ejemplo, como se describe en la presente memoria en el Ejemplo 1.

#### Vectores de expresión y líneas celulares

En determinadas realizaciones, la presente invención engloba ácidos nucleicos (por ejemplo, vectores de ADN) que codifican una ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas) y su uso en la modulación de la expresión de un producto de ácido nucleico. La presente invención se refiere a métodos para insertar la secuencia del resto mutante de ARN de auto-escisión en un gen endógeno en una célula, o en un gen exógeno para ser introducido en una célula por un vector. En cualquier caso, los elementos necesarios (por ejemplo, promotores) están presentes para la transcripción de la secuencia insertada. Por ejemplo, una ribozima de auto-escisión se inserta en un vector de expresión apropiado que contiene los elementos necesarios para la transcripción de la secuencia insertada. El vector de expresión se transfecta entonces en una célula huésped con el fin de efectuar la expresión de la secuencia que codifica la ribozima y para determinar su efecto en la función génica en la célula transfectada y/o su progenie.

En una realización, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (por ejemplo, una construcción de ADN) que comprende un promotor, ADN que codifica un producto de ácido nucleico unido de forma operativa al promotor, y ADN que codifica una ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas) que está en 3' del promotor. La transcripción de los dos componentes de ADN en la construcción produce una molécula de ARN que comprende la ribozima de auto-escisión y ARNm que codifica el producto de ácido nucleico, y la ribozima de auto-escisión puede escindir el ARN intramolecularmente.

En otra realización, la presente invención se refiere a un vector viral que comprende un promotor, un ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico unido de forma operativa al promotor y un ácido nucleico que codifica una ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas) que está 3' del promotor. La transcripción de los dos componentes de ácido nucleico en el vector viral produce una molécula de ARN que comprende una ribozima de auto-escisión y ARNm que codifica el producto de ácido nucleico, y la ribozima de auto-escisión puede escindir el ARN intramolecularmente. En otra realización, la presente invención se refiere a un virus que comprende un promotor, una secuencia de nucleótidos que codifica un producto de ácido nucleico unido de forma operativa al promotor y una secuencia de nucleótidos que codifica una ribozima de auto-escisión que está 3' del promotor. La transcripción de las dos secuencias de nucleótidos en el virus produce una molécula de ARN que comprende una ribozima de auto-escisión y ARNm que codifica el producto de ácido nucleico, y la ribozima de auto-escisión puede escindir el ARN intramolecularmente.

Las construcciones de ADN que codifican una ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas) de la presente invención pueden prepararse según métodos generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican una ribozima de auto-escisión pueden prepararse por síntesis química o tecnología de ADN/ARN recombinante (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York (1989); y Ausubel et al., Eds., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1997)).

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un kit para regular la expresión génica. El kit objeto comprende un ácido nucleico que comprende: (a) una ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas); y (b) un sitio de clonación para la introducción de una secuencia de nucleótidos diana que se va a transcribir unida de forma operativa a la ribozima de auto-escisión. Opcionalmente, el kit puede comprender además un inhibidor de la ribozima de auto-escisión. La transcripción de la secuencia de nucleótidos diana se inhibe en ausencia del inhibidor, mientras la transcripción de la secuencia de nucleótidos diana se induce en presencia del inhibidor. Por ejemplo, un mutante de ribozima de esquistosoma comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NOs: 1-63. El inhibidor del kit como se describe más adelante incluye, pero no está limitado a, toyocamicina, 8-azaadenosina, sangivamicina, tubercidina, tubercidina-monofosfato cíclico, tubercidina-monofosfato, tubercidina-trifosfato, nebularina, nucleósido tricíclico, 5-fluorouridina, 5-bromouridina, 5-fluorouracilo, Syto-83, bromuro de homidio, y naranja de acridina.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para modular la expresión de un producto de ácido nucleico que comprende producir un ácido nucleico que codifica una ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas), como se describe en la presente memoria, y un producto de ácido nucleico, en el que la ribozima de auto-escisión modula la expresión del producto de ácido nucleico. El producto de ácido nucleico puede ser un polipéptido, ADN o ARN distinto del ARN de auto-escisión y puede expresarse en células como un componente de una construcción de ADN. El producto de ácido nucleico que se va a expresar puede ser una proteína terapéutica.

Es deseable que la ribozima objeto (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas) se auto-escinda suficientemente de manera que el producto de ácido nucleico diana no se expresa. Dicha auto-escisión sustancial facilitaría la observación del efecto de depleción de la función génica en el organismo. Aunque es deseable, la auto-escisión completa de la ribozima no se requiere por los métodos de la invención, siempre que la ribozima resulte en un nivel reducido de un producto de ácido nucleico diana respecto a un control. El término "nivel reducido de un producto de ácido nucleico diana respecto a un control" se refiere a una cantidad de un producto de ácido nucleico diana que es menor de, preferiblemente al menos 20% menor de, más preferiblemente al menos 50% menor de, aún más preferiblemente al menos 90% menor de la cantidad de un producto de ácido nucleico diana en un control (por ejemplo, una muestra correspondiente en ausencia de la ribozima, o en presencia de una ribozima que es incapaz de auto-escisión), y lo más preferiblemente está en el nivel de fondo de, o es indetectable por, hibridación por transferencia Northern como se describe en la presente memoria. La invención no requiere, y no está limitada a, métodos en los que un producto de ácido nucleico diana se elimina en un 99% ó 100%.

En otra realización, la presente invención se refiere a un método para modular la expresión de un producto de ácido nucleico en una célula que comprende introducir en una célula una construcción de ADN que comprende: (a) promotor, (b) un ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico que está unido de forma operativa al promotor y (c) un ácido nucleico que codifica una ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas) en 3' del promotor. La transcripción de los componentes de ácido nucleico produce una molécula de ARN (ARNm) que comprende la ribozima de auto-escisión y ARNm que codifica el producto de ácido nucleico de manera que la ribozima de auto-escisión escinde el ARN intramolecularmente, modulando así la expresión del producto de ácido nucleico.

Si la construcción de ADN está presente en células bajo condiciones que permiten la expresión de los dos componentes de nucleótido, la molécula de ARN que comprende la ribozima de auto-escisión y ARNm que codifica el producto de ácido nucleico se produce, la ribozima de auto-escisión codificada se escinde espontáneamente y, como resultado, el producto de ácido nucleico no se produce. Por otra parte, si la construcción de ADN está presente en células en presencia de un agente, tal como un fármaco (por ejemplo, un antibiótico), que inhibe (totalmente o parcialmente) la actividad de escisión de la ribozima de auto-escisión codificada, el producto de ácido nucleico deseado se produce.

La presente invención también engloba otros elementos estructurales que pueden afectar la estabilidad y/o la actividad de la ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas), bien positivamente o negativamente. Por ejemplo, se ha determinado que las secuencias ARN adyacentes al sitio catalítico de la ribozima de auto-escisión afectan su actividad de escisión. La actividad de escisión de la ribozima de auto-escisión puede modularse por la unión de un efector a un aptámero que se injerta en la ribozima de auto-escisión en una localización de manera que la actividad de escisión puede controlarse por la unión del efector al aptámero.

También, el objeto de la presente invención es una construcción de ADN útil en el presente método para controlar la expresión de un producto de ácido nucleico deseado en una célula. En una realización, la construcción de ADN comprende: (a) ADN que codifica un producto de ácido nucleico que se va a expresar en la célula; y (b) ADN que codifica una ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas). La transcripción de los dos componentes de ADN en la construcción rinde un ARNm que comprende la ribozima de auto-escisión y ARNm que codifica el producto de ácido nucleico que se va a expresar. Los componentes de la construcción pueden separarse mediante ADN interviniente, tal como un conector, siempre que el ADN interviniente no interfiera con la capacidad de la actividad de escisión de la ribozima de auto-escisión codificada para interrumpir (escindir) el ARNm que codifica el producto de ácido nucleico deseado, inhibiendo/bloqueando de esta manera la expresión del producto de ácido nucleico deseado. Esta realización de la construcción de ADN puede introducirse en células receptoras/huésped apropiadas de manera tal que la construcción se integra en el ADN genómico de la célula huésped en una localización que resulta en su unión de forma operativa a un promotor de la célula huésped (ADN suficiente para iniciar la transcripción) y, como resultado, se expresa bajo el control de la maquinaria de la célula huésped. Si la célula huésped se mantiene bajo condiciones apropiadas para la expresión de ADN en la célula huésped (incluyendo expresión del ADN de la construcción de ADN introducida y ahora integrada), el producto de ácido nucleico deseado codificado no se expresa porque la ribozima de auto-escisión se produce y su actividad resulta en la interrupción del transcrito resultante (ARNm), que no puede traducirse posteriormente. Como resultado, el producto de ácido nucleico codificado no se expresa. Si la célula huésped que contiene la construcción de ADN de esta realización se mantiene bajo condiciones apropiadas para la expresión de ADN en la célula huésped y en presencia de un agente tal como un antibiótico (que previene la actividad de la ribozima de auto-escisión codificada), la interrupción del transcrito resultante no ocurre y el producto de ácido nucleico deseado codificado se expresa. En esta realización, en la que la construcción de ADN se integra en el ADN genómico de la célula huésped, la construcción puede comprender ADN adicional que incrementa el grado en el que la construcción de ADN se integra en el ADN genómico de la célula huésped y/o direcciona o dirige la introducción de la construcción en una localización genómica específica. La construcción de esta realización también puede incluir componentes adicionales, tal como un potenciador y sitios de unión transcripcionales.

En una realización alternativa, la construcción de ADN comprende además ADN suficiente para el inicio de la transcripción (tal como un promotor) unido de forma operativa al ADN que codifica el producto de ácido nucleico

deseado. En una realización particular, el ADN que codifica la ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas) está 5' del ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado. Así, el orden de los componentes en la construcción (de 5' a 3') es: promotor - ADN que codifica una ribozima de auto-escisión - ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado. En una segunda realización, el ADN que codifica la ribozima de auto-escisión está 3' del ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado. Así, el orden de los componentes en la construcción (de 5' a 3') es: promotor- ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado - ADN que codifica una ribozima de auto-escisión.

En determinados aspectos, la construcción de ADN de la invención comprende un promotor que incluye, pero no está limitado a, promotor tARN, promotores 5S rARN, promotores de gen de histona, promotor CMV, promotor RSV, promotor SV40, promotor PEPCK, promotor MT, promotor SR $\alpha$ , promotores de la familia P450, promotor GAL7, promotor T7, promotor T<sub>3</sub>, promotor SP6, y promotor K<sub>11</sub>. El promotor T7, promotor T<sub>3</sub>, promotor SP6, y promotor K<sub>11</sub> se han descrito en la Pat. U.S. No. 5.591.601, cuyos contenidos completos se incorporan por referencia.

La invención se refiere a líneas celulares de empaquetamiento útiles para generar vectores virales y virus recombinantes que comprenden un genoma recombinante que incluye una secuencia de nucleótidos (ARN o ADN) que representa una construcción de ADN de la presente invención; construcción de dichas líneas celulares; y métodos para usar los vectores virales recombinantes para modular a producción de un producto de ácido nucleico deseado *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. En una realización particular, los vectores virales y virus recombinantes comprenden un genoma recombinante que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas), una secuencia de nucleótidos que codifica un producto de ácido nucleico deseado y un promotor unido de forma operativa a la secuencia de nucleótidos que codifica el producto de ácido nucleico deseado, como se describe en la presente memoria.

Las líneas celulares útiles para generar vectores virales y virus recombinantes que comprenden un genoma recombinante que incluye una secuencia de nucleótidos que representa una construcción de ADN de la presente invención se producen transfectando células huésped, tal como células huésped de mamífero, con un vector viral que incluye la construcción de ADN integrada en el genoma del virus, como se describe en la presente memoria. Las preparaciones madre virales se recogen según métodos generalmente conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel et al., Eds., Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York (1998); Sambrook et al., Eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York (1989); Danos y Mulligan, Patente U.S. No. 5.449.614; y Mulligan y Wilson, Patente U.S. No. 5.460.959. Los vectores virales recombinantes producidos por las líneas celulares de empaquetamiento de la presente invención también se refieren en la presente memoria como vectores virales que representan la construcción de ADN.

#### Métodos de administración de ácidos nucleicos

Las construcciones de ADN que codifican una ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas) pueden introducirse en una célula por una variedad de métodos (por ejemplo, transformación, transfección, captación directa, bombardeo de proyectiles, usando liposomas). La presente invención contempla cualesquiera métodos generalmente conocidos en la técnica que son apropiados para el agente o efector particular y tipo de célula. Por ejemplo, los agentes y efectores pueden introducirse en una célula por captación directa, DEAE-dextrano, precipitación con fosfato de calcio, lipofección, fusión celular, electroporación, biolística, microinyección, infección (por ejemplo, por virus de ADN y virus de ARN) y transducción mediada por retrovirus. Dichos métodos se describen con más detalle, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York (1989); y Ausubel, et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York (1998). Otros métodos adecuados también se describen en la técnica.

Un vector que comprende una construcción de ADN también puede introducirse en una célula dirigiendo el vector a los fosfolípidos de la membrana de la célula. Por ejemplo, el direccionamiento de un vector de la presente invención puede conseguirse uniendo la molécula del vector a una proteína VSV-G, una proteína viral con afinidad para todos los fosfolípidos de la membrana celular. Dicha construcción puede producirse usando métodos muy conocidos para los expertos en la técnica.

En una realización particular, una construcción de ADN que codifica una ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas) se inserta en un vector de ácido nucleico, por ejemplo, un plásmido de ADN, virus u otro replicón adecuado (por ejemplo, vector viral). Los vectores virales incluyen retrovirus, adenovirus, parvovirus (por ejemplo, virus adeno-asociados), coronavirus, virus de ARN de cadena negativa tal como ortomixovirus (por ejemplo, virus de influenza), rhabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia y estomatitis vesicular), paramixovirus (por ejemplo, paperas y Sendai), virus de ARN de cadena positiva tal como picornavirus y alphavirus, y virus de ADN bicatenario incluyendo adenovirus, herpesvirus (por ejemplo, virus del Herpes Simple tipos 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus), y poxvirus (por ejemplo, vaccinia, viruela aviar y viruela de canario). Otros virus incluyen virus Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus, y virus de hepatitis, por ejemplo. Los ejemplos de retrovirus incluyen: leucosis-sarcoma aviar, virus de mamíferos de tipo C, tipo B, tipo D, grupo HTLV-BLV, lentivirus, spumavirus (Coffin, J.M., Retroviridae: The viruses and their replication, En Fundamental Virology, Tercera Edición, B.N. Fields, et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers,

Filadelfia, 1996). Otros ejemplos incluyen virus de leucemia murina, virus de sarcoma murino, virus de tumor mamario de ratón, virus de leucemia bovina, virus de leucemia felina, virus de sarcoma felino, virus de leucemia aviar, virus de leucemia de células T humanas, virus endógeno de babuino, virus de leucemia de mono gibón, virus de mono Mason Pfizer, virus de inmunodeficiencia de simios, virus de sarcoma de simios, virus de sarcoma de Rous y lentivirus. Otros ejemplos de vectores se describen, por ejemplo, en McVey et al., Patente U.S. No. 5.801.030.

Como un ejemplo particular de la estrategia anterior, una construcción de ADN de la invención puede integrarse en el genoma de un virus que entra en la célula. Por infección de la célula, los componentes de un sistema que permite la expresión del ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado y la escisión espontánea del ARNm correspondiente, se introducen en la célula. Bajo las condiciones apropiadas, la escisión espontánea del ARNm correspondiente ocurre y la expresión del producto codificado se inhibe.

Las preparaciones madre de virus que consisten en vectores virales recombinantes que comprenden un genoma recombinante que incluye una secuencia de nucleótidos (ADN o ARN) que representa una construcción de ADN de la presente invención, se producen manteniendo las células transfectadas bajo condiciones adecuadas para la producción de virus. Dichas condiciones, que no son críticas para la invención, son conocidas generalmente en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York (1989); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1998); Patente U.S. No. 5.449.614; y Patente U.S. No. 5.460.959. Los vectores virales recombinantes resultantes pueden usarse, como se describe en la presente memoria, para modular la producción de un producto de ácido nucleico deseado *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*.

Así, la invención también se refiere a vectores virales y virus recombinantes que comprenden un genoma recombinante que incluye una secuencia de nucleótidos (ADN o ARN) que representa una construcción de ADN de la presente invención. Los vectores virales y virus que comprenden las construcciones de ADN o el ARN codificado (transcrito de forma inversa) también son el objeto de la presente invención.

En determinadas realizaciones, la presente invención contempla un método para inhibir la expresión de un producto de ácido nucleico en células huésped, que comprende introducir una ribozima de auto-escisión sola (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas) en células. Las células que comprenden el resto mutante de ARN se cultivan bajo condiciones apropiadas para que el resto mutante de ARN se empareje con y escinda el ARNm que codifica el producto de ácido nucleico. La secuencia de la ribozima de auto-escisión puede producirse por métodos de síntesis química o por técnicas de ácido nucleico recombinante. Por ejemplo, puede usarse ARN polimerasa clonada para la transcripción *in vitro*. La secuencia de ribozima de auto-escisión producida puede prepararse para incluir modificaciones bien el núcleo de fosfato-azúcar o el nucleósido, por ejemplo, para reducir la susceptibilidad a nucleasas celulares, mejorar la biodisponibilidad, mejorar las características de formulación, y/o cambiar otras propiedades farmacocinéticas. La secuencia de ribozima de auto-escisión puede producirse enzimáticamente o por síntesis orgánica parcial/total, cualquier ribonucleótido modificado puede introducirse por síntesis enzimática u orgánica *in vitro*. La secuencia de ribozima de auto-escisión puede introducirse entonces en células por los métodos convencionales descritos anteriormente que se usan rutinariamente para administrar ácidos nucleicos.

#### Métodos para identificar reguladores de ribozima

La presente invención se refiere a un método para cribar un agente que es capaz de inhibir la actividad catalítica de una ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas). En una realización de este método, se introduce en células huésped una construcción de ADN que comprende: (1) ADN que codifica un informador, (2) un promotor unido de forma operativa al ADN que codifica el informador, y (3) ADN que codifica una ribozima de auto-escisión, en el que el ADN de (1) y el ADN de (3) están en 3' del promotor, y la transcripción del ADN de (1) y el ADN de (2) rinde un ARNm que comprende la ribozima de auto-escisión y ARNm que codifica el informador. Las células huésped se ponen en contacto con un agente que se va a evaluar para su capacidad de inhibir la actividad catalítica de la ribozima de auto-escisión bajo condiciones apropiadas para la expresión del informador, y la actividad del informador se ensaya en las células huésped. Si la actividad del informador se detecta, el ARNm que codifica el informador no se escinde, indicando que la actividad catalítica de la ribozima de auto-escisión se inhibe por el agente.

El término "informador" se refiere a una proteína o polipéptido cuya actividad puede ensayarse directamente y fácilmente usando técnicas estándar. Los ejemplos de informadores incluyen enzimas, tal como  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucoronidasa,  $\beta$ -glucosidasa, cloranfenicol acetil transferasa (CAT) bacteriana, moléculas luminiscentes, tal como proteína fluorescente verde y luciferasa de luciérnaga, y marcadores auxotróficos tal como His3p y Ura3p. Véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 9, John Wiley & Sons, Inc. (1998).

La presente invención también se refiere a un método para cribar un efector que se une a un aptámero deseado (o secuencia de ARN). En una realización de este método, se introduce en células huésped una construcción de ADN que representa la construcción de ADN, en el que la construcción de ADN comprende: (1) ADN que codifica un informador, (2) un promotor unido de forma operativa al ADN que codifica el informador y (3) ADN que codifica una ribozima de auto-escisión que comprende un aptámero deseado (o secuencia de ARN) injertado en una posición de

manera que la actividad de escisión de la ribozima de auto-escisión es regulable por la unión de un efector al aptámero (o secuencia de ARN), en el que el ADN de (1) y el ADN de (3) están en 3' del promotor, y la transcripción del ADN de (1) y el ADN de (3) produce un ARNm que comprende el aptámero-ribozima de auto-escisión (o secuencia de ARN-ribozima de auto-escisión) y ARNm que codifica el informador. Las células huésped se ponen en contacto con un agente que se va a evaluar para su capacidad de unirse al aptámero (o secuencia de ARN) bajo condiciones apropiadas para la expresión del informador, y la actividad del informador se ensaya en las células huésped. Si el agente se une al aptámero (o secuencia de ARN), la actividad de escisión del resto de ARN de auto-escisión se inhibe y, como resultado, el ARNm que codifica el informador no se escinde y el informador se produce. Por lo tanto, si la actividad del informador se detecta, el agente se identifica como un efector que se une al aptámero deseado (o secuencia de ARN).

La invención también se refiere a un método para cribar un agente que es capaz de inhibir la actividad catalítica de una ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas) incluyendo una secuencia aleatoria en una posición en la ribozima de auto-escisión capaz de modular la actividad de escisión de la ribozima de auto-escisión que comprende: (a) introducir en células huésped una construcción de ADN que representa la construcción de ADN, en el que la construcción de ADN comprende: (1) un promotor; (2) ADN que codifica un informador unido de forma operativa al promotor; y (3) ADN que codifica una ribozima de auto-escisión modificada para incluir una secuencia aleatoria en una posición en la ribozima de auto-escisión capaz de modular la actividad de escisión del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión, en el que el ADN de (2) y el ADN de (3) están en 3' del promotor, y la transcripción del ADN de (2) y el ADN de (3) rinde un ARNm que comprende la ribozima de auto-escisión incluyendo la secuencia aleatoria y ARNm que codifica el informador; (b) poner en contacto las células huésped con un agente que se va a evaluar para su capacidad de inhibir la actividad catalítica de la ribozima de auto-escisión incluyendo la secuencia aleatoria bajo condiciones apropiadas para la expresión del informador; y (c) ensayar la actividad del informador en las células huésped. Si la actividad del informador se detecta, el ARNm que codifica el informador no se escinde, indicando que la actividad catalítica de la ribozima de auto-escisión incluyendo la secuencia aleatoria se inhibe por el agente.

Los agentes, tal como fármacos, compuestos químicos, compuestos iónicos, compuestos orgánicos, ligandos orgánicos, incluyendo cofactores, sacáridos, péptidos, proteínas, peptoides sintéticos y recombinantes, y otras moléculas y composiciones, pueden cribarse individualmente o uno o más agentes pueden ensayarse simultáneamente para la capacidad de modular la actividad de escisión de una ribozima de auto-escisión o para la capacidad de unirse a un resto de aptámero según los métodos descritos en la presente memoria. Cuando se ensaya una mezcla de agentes, los agentes seleccionados por los métodos descritos pueden separarse e identificarse por métodos adecuados (por ejemplo, PCR, secuenciación, cromatografía). Uno o más agentes en una muestra de ensayo que modulan la actividad de escisión de una ribozima de auto-escisión pueden determinarse según estos métodos. De forma similar, los agentes en una muestra de ensayo que se unen a un resto de aptámero también pueden determinarse.

Pueden ensayarse grandes bibliotecas combinatorias de agentes (por ejemplo, compuestos orgánicos, péptidos, peptoides, ácidos nucleicos recombinantes o sintéticos) producidas por síntesis química combinatoria u otros métodos (véase, por ejemplo, Zuckerman, R.N. et al., *J. Med. Chem.*, 37:2678-2685 (1994) y las referencias citadas en ella; véase también, Ohlmeyer, M.H.J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10922-10926 (1993) y DeWitt, S.H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909-6913 (1993), relacionadas con compuestos etiquetados; Rutter, W.J. et al. Patente U.S. No. 5.010.175; Huebner, V.D. et al., Patente U.S. No. 5.182.366; y Geysen, H.M., Patente U.S. No. 4.833.092).

Cuando los agentes seleccionados de una biblioteca combinatoria portan etiquetas únicas, es posible la identificación de agentes individuales por métodos cromatográficos. Además, pueden ensayarse (cribarse) bibliotecas químicas, caldos microbianos y bibliotecas de exposición en fago según los métodos de la presente memoria.

En una realización adicional, la actividad de escisión de una ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas) puede inhibirse (parcialmente o totalmente) usando un agente tal como un fármaco (por ejemplo, un antibiótico) u otra molécula o composición, que inhibe (parcialmente o totalmente) la actividad de escisión de la ribozima de auto-escisión. La inhibición de la escisión espontánea del ARNm correspondiente resulta en la inducción eficiente de la expresión del producto de ácido nucleico de interés. Los antibióticos que pueden usarse para inhibir la actividad de escisión de una ribozima de auto-escisión incluyen antibióticos aminoglicósido, tal como, pero no limitado a, neomicina B, sulfato de neomicina, adriamicina RDF, doxorubicina, Bisbenzimidazoles, quelocardina, acetato de diminazeno, ribostamicina, paromomicina, neamina, gentamicina, complejo de gentamicina C, sulfato de gentamicina C1A, sulfato de gentamicina, gramicidina S HCL, lincomicina, kanamicina, tobramicina, tuberactinomicina A, tuberactinomicina B, 6'-amino-6'-deoxikanamicina y 5'-epi-sisomicina; tetraciclinas y sus derivados y análogos, tal como, pero no limitado a, tetraciclina, clortetraciclina, demeclociclina, quelocardina y 4-epi-anhidroclortetraciclina; antibióticos peptídicos, tal como, pero no limitado a, viomicina, di-β-lisil capreomicina IIA y tuberactinomicina A; y antibióticos pseudodisacáridos, tal como, pero no limitado a, 2'-de-N-1-β-lisillisimomicina, 3-epi-6'-de-C-metilfortimicina B y 3-epi-2'-N-1-β-lisil-6'-de-C-metilfortimicina B. Otros antibióticos que pueden usarse para inhibir la actividad de escisión de una ribozima de auto-escisión son conocidos y se describen en la técnica. Véase, por ejemplo, Stage et al., *RNA*, 1 :95-101 (1995); Clouet-d'Orval et

al., *Biochem.*, 34:11186-11190 (1995); Murray y Arnold, *Biochem. J.*, 317:855-860 (1996); Hermann y Westhof, *J. Mol. Biol.*, 276:903-912 (1998); y Rogers et al, *J. Mol. Biol.*, 259:916-925 (1996).

5 En determinadas realizaciones específicas, los inhibidores de una ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas) incluyen, pero no están limitados a, oligonucleótidos antisentido de la ribozima y cualquier forma modificada de los oligonucleótidos antisentido. Por ejemplo, un oligonucleótido antisentido se empareja por bases con una región del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión como se representa en la Figura 1e. Como resultado, la actividad de la ribozima de auto-escisión se inhibe (parcialmente o totalmente) por el oligonucleótido antisentido. En determinados casos, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido modificado seleccionado del grupo que consiste en: mofolino, ARN fosforotioato, ARN 2'-O-

10 metilo, y ARN fosforotioato 2'-O-metoxietilo.

En otras realizaciones específicas, los inhibidores de una ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas) incluyen, pero no están limitados a, los compuestos listados en la Tabla 2, tal como toyocamicina, 5-fluorouridina, y 5-fluorouracilo.

15 En determinadas realizaciones, la presente invención contempla un método para determinar el nivel de un inhibidor de una ribozima (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas) en una muestra biológica. El término "determinar" se usa en la presente memoria para hacer referencia a cualquier proceso de observación de un inhibidor en una muestra biológica, ya se detecte o no realmente e inhibidor. La determinación del nivel de un inhibidor puede ser una observación cuantitativa, semi- cuantitativa o no cuantitativa. Dichos métodos pueden usarse para determinar un inhibidor que está presente en una célula o en una muestra biológica. Los inhibidores

20 ejemplares incluyen 5-fluorouracilo y 5-fluorouridina. Tal y como se usa en la presente memoria, los compuestos 5-FU incluyen 5-fluorouracilo y sus derivados metabolitos tal como 5-fluorouridina.

El 5-fluorouracilo se usa ampliamente en el tratamiento de un gran rango de tumores y según varios esquemas. Algunos estudios han demostrado una relación entre las concentraciones plasmáticas de 5-fluorouracilo y los efectos tóxicos y terapéuticos del tratamiento en diferentes tipos de tumores (Beerblock, et al., 1997, *Cancer* 79: 1100; Trump, et al., 1991, *J. Clin. Oncol.* 11: 2027; Gamelin, et al., 1996, *Cancer* 77:441; Gamelin, et al., 1998, *J. Clin. Oncol.* 16:1470; Milano, et al., 1994, *J. Clin. Oncol.* 12:1291). Estos descubrimientos fueron la base para la determinación de un rango terapéutico para el compuesto 5-FU, que es esencial para ajustar según el individuo la dosificación de compuesto. Por ejemplo, mediante la dosificación individual basada en las concentraciones de 5-FU, Gamelin et al. alcanzaron un porcentaje de respuestas objetivas de 56% Gamelin, et al., 1998, *J. Clin. Oncol.* 16:1470), mientras este valor fue aproximadamente 15% para 5-FU en monoterapia.

25

30

También se describe un método para determinar el nivel de compuesto 5-FU en una célula, que comprende:

(a) introducir en una célula una construcción de ADN que comprende: (1) un promotor; (2) ácido nucleico que codifica un informador; y (3) ácido nucleico que codifica una ribozima (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas), en el que el ácido nucleico de (2) y el ácido nucleico de (3) están en 3' del promotor y unido de forma operativa a dicho promotor, bajo condiciones que resultan en la inhibición de la ribozima y la expresión del informador; y

35

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

en el que el nivel de dicho compuesto 5-FU en la célula se identifica comparando la actividad del informador con un control apropiado.

40 También se describe un método para determinar el nivel de un compuesto 5-FU en una muestra biológica que comprende:

(a) poner en contacto una célula con una muestra biológica, en el que la célula expresa una construcción de ADN que comprende: (1) un promotor; (2) un ácido nucleico que codifica un informador; y (3) un ácido nucleico que codifica una ribozima (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas), en el que el ácido nucleico de (2) y el ácido nucleico de (3) están en 3' del promotor y unido de forma operativa a dicho promotor, bajo condiciones que resultan en la inhibición de la ribozima y la expresión del informador; y

45

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

en el que el nivel del compuesto 5-FU en la muestra biológica se identifica comparando la actividad del informador con un control apropiado.

50 Como se describe en los ejemplos de trabajo, los Solicitantes han encontrado que los compuestos 5-FU inhibían la actividad de una ribozima (por ejemplo, un mutante de ribozima de auto-escisión de esquistosoma) de una manera dependiente de la dosis. En determinados casos, un control apropiado del método puede ser un panel de referencia incluyendo valores medios predeterminados que se han desarrollado poniendo en contacto la célula con varias dosis de un compuesto 5-FU. Las muestras biológicas ejemplares del método incluyen, pero no están limitados a, células

vivas o tejidos (*in vivo* o *in vitro*), lisados o extractos de células o tejidos, y fluidos corporales (por ejemplo, sangre, suero, plasma, una fracción derivada de sangre, heces, efluente clónico u orina).

En otras realizaciones, la presente invención proporciona métodos para inhibir la actividad de un ARN catalítico (por ejemplo, una ribozima o mutantes de ésta) en una célula y métodos para inhibir la infección por un virus o un microorganismo patogénico en una célula. Tradicionalmente, el descubrimiento farmacéutico se ha centrado en los compuestos que tienen como diana los productos proteicos de genes, mientras los ARN como dianas de fármacos han permanecido en gran medida inexplorados. Recientemente, están creciendo los intereses en los ARN (Zaman GJR 2003; Hermann T, 1998; Pearson ND, 1997). Ha habido esfuerzos para tomar como diana ARN catalíticos en virus y microorganismos patogénicos con moléculas pequeñas (Rogers J, 1996, *supra*). En los métodos de la presente invención, las células que se han infectado o están en riesgo de tener una infección por un virus o un microorganismo patogénico (por ejemplo, un parásito) se ponen en contacto con cualquiera de los inhibidores como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, Tabla 2). Estos inhibidores interfieren con la actividad catalítica del ARN preferiblemente a través de la incorporación de ARN y pueden usarse para tomar como diana cualesquiera actividades catalíticas de ARN implicadas en función (por ejemplo, replicación del genoma) de los virus o microorganismos patogénicos.

En determinados aspectos, los virus de los métodos incluyen, pero no están limitados a, virus de hepatitis (por ejemplo, C, B, y delta), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus herpes, y papilomavirus humano (HPV). En otros aspectos, los microorganismos patogénicos de los métodos incluyen, pero no están limitados a, *Notophthalmus viduascens*, *Ambystoma talpoideum*, *Amphiuma tridactylum*, y *Schistosoma mansoni*. Las células de los métodos pueden ser células animales (por ejemplo, células de mamíferos tal como células humanas) o células de plantas (por ejemplo, tabaco).

#### Métodos de tratamiento y administración

En determinadas realizaciones, los agentes y efectores de la presente invención pueden introducirse en una célula para aplicaciones terapéuticas. Tal y como se usa en la presente memoria, una célula incluye, pero no está limitado a, una célula procariota, tal como una célula bacteriana, y célula eucariota, tal como una célula de animal, planta o levadura. Una célula que es de origen animal o de planta puede ser una célula madre o una célula somática. Las células animales adecuadas pueden ser, por ejemplo, de origen mamífero o aviar. Los ejemplos de células de mamíferos incluyen células humanas (tal como células HeLa), bovinas, ovinas, porcinas, murinas (tal como células madre embrionarias), de conejo y mono (tal como células COS1). La célula puede ser una célula embrionaria, célula madre de la médula ósea u otra célula progenitora. Cuando la célula es una célula somática, la célula puede ser, por ejemplo, una célula epitelial, fibroblasto, célula de músculo liso, célula sanguínea (incluyendo una célula hematopoyética, célula roja de la sangre, célula T, célula B, etc.), célula tumoral, célula de músculo cardíaco, macrófago, célula dendrítica, célula neuronal (por ejemplo, una célula glial o astrocito), o célula infectada por patógeno (por ejemplo, las infectadas por bacterias, virus, virusoides, parásitos, o priones).

Las células pueden obtenerse comercialmente o de un depósito u obtenerse directamente de un individuo, tal como por biopsia. Las células usadas pueden obtenerse de un individuo al que se devolverán o de otro individuo diferente de la misma o diferente especie. Por ejemplo, las células no humanas, tal como células de cerdo, pueden modificarse para incluir una construcción de ADN e introducirse entonces en un ser humano. Alternativamente, no es necesario aislar la célula del individuo cuando, por ejemplo, es deseable administrar el vector al individuo en terapia génica.

Por ejemplo, también se describe un método para regular la expresión de un gen endógeno (un gen residente en una célula como se obtuvo la célula) para producir un producto de ácido nucleico deseado y composiciones útiles en el método. El gen endógeno puede ser uno que se expresa ("activado") en la célula o uno que normalmente no se expresa ("inactivado") en la célula, pero cuya expresión es o se ha activado. El ADN que codifica una ribozima de auto-escisión (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas), o un virus o vector viral que comprende un genoma recombinante que incluye una secuencia de nucleótidos (ARN o ADN) que representa ADN que codifica una ribozima de auto-escisión, puede introducirse en ADN genómico de células en una posición tal que en el ARNm producido por las células, la ribozima de auto-escisión está en una localización que resulta en el control de la expresión del producto codificado. En ausencia de un agente que inhibe la expresión de la ribozima de auto-escisión, la escisión ocurre y el producto de ácido nucleico deseado no se expresa. En presencia de dicho agente, la actividad de escisión se inhibe y el producto de ácido nucleico deseado se expresa. En una realización, el ADN que codifica una ribozima de auto-escisión, o un virus o vector viral que comprende un genoma recombinante que incluye una secuencia de nucleótidos (ARN o ADN) que representa ADN que codifica una ribozima de auto-escisión, se introduce en ADN genómico entre el promotor unido de forma operativa a (controlando la expresión de) el gen endógeno que codifica el producto de ácido nucleico deseado, de manera tal que el gen endógeno permanece unido de forma operativa al promotor. En una realización alternativa, el ADN que codifica una ribozima de auto-escisión, o el virus o vector viral, se introduce en ADN genómico 3' del gen endógeno que codifica el producto de ácido nucleico deseado. El promotor que está unido de forma operativa al gen endógeno que se va a expresar puede ser un promotor natural (endógeno) para el gen o puede ser un promotor exógeno introducido en el ADN genómico. Las células resultantes pueden usarse, como se describe en la presente memoria, para modular la producción del producto de ácido nucleico deseado en un individuo.

La presente invención también se refiere a células (células huésped) que comprenden una construcción de ADN de la invención. Las células particulares que comprenden una construcción de ADN de la invención se han discutido anteriormente.

5 En una realización particular, una ribozima (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas) de la invención y construcción de ADN que codifica la ribozima pueden usarse para producir animales transgénicos cuyas células contienen y expresan la ribozima. Hay una variedad de técnicas para producir animales transgénicos de la presente invención. Por ejemplo, el ácido nucleico extraño puede introducirse en la línea germinal de un animal, por ejemplo, introduciendo el material genético extraño adicional en un gameto, tal como un huevo. Alternativamente, los animales transgénicos pueden producirse criando animales que transfieren el ADN extraño a su progenie. También es posible producir animales transgénicos introduciendo ADN extraño en células somáticas a partir de las que se produce un animal. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "animal transgénico" incluye animales producidos a partir de células modificadas para contener ADN extraño o por cría; esto es, incluye la progenie de animales (ancestros) que se produjeron a partir de dichas células modificadas. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "ácido nucleico extraño" se refiere material genético obtenido de una fuente distinta del plasma germinal parental. Preferiblemente, los animales transgénicos derivan de embriones de mamíferos.

En determinados aspectos, la invención proporciona un animal no humano homólogo recombinante que expresa la ribozima (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas). El término "animal homólogo recombinante" tal y como se usa en la presente memoria se pretende que describa a un animal que contiene un gen que se ha modificado por recombinación homóloga entre el gen y una molécula de ADN introducida en una célula del animal, por ejemplo, una célula embrionaria del animal. Puede crearse un animal en el que el ácido nucleico que codifica la ribozima se ha introducido en un sitio específico del genoma.

Para crear dicho animal homólogo recombinante, se prepara un vector que contiene ADN que codifica la ribozima flanqueado en sus extremos 5' y 3' por ácido nucleico adicional de un gen eucariota en el que ocurre la recombinación homóloga. El ácido nucleico adicional que flanquea el que codifica la ribozima tiene una longitud suficiente para recombinación homóloga exitosa con el gen eucariota. Típicamente, se incluyen varias kilobases de ADN flanqueante (tanto en el extremo 5' como 3') en el vector (véase, por ejemplo, Thomas, K. R. y Capecchi, M. R. (1987) Cell 51:503 para una descripción de vectores de recombinación homóloga). El vector se introduce en una línea celular madre embrionaria (por ejemplo, por electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado de forma homóloga con el ADN endógeno (véase, por ejemplo, Li, E. et al. (1992) Cell 69:915).

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

Los métodos para adquirir, cultivar, mantener e introducir secuencias de ácido nucleico extraño en huevos receptores para la producción de animales transgénicos son muy conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Hogan et al., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1986). Preferiblemente, una construcción de ADN se administrará en el embrión en un estadio muy temprano del desarrollo de manera que sólo una pequeña frecuencia de los embriones es mosaico (por ejemplo, un embrión en el que la integración del ácido nucleico extraño ocurre después del estadio de una célula del desarrollo).

45 Las construcciones de ADN de la presente invención pueden usarse en métodos para inducir la expresión de un producto de ácido nucleico deseado en un individuo (por ejemplo, un ser humano u otro mamífero o vertebrado). En estos métodos, una construcción de ADN de la presente invención puede introducirse en células obtenidas del individuo. Las células pueden ser migratorias, tal como una célula hematopoyética, o no migratorias, tal como una célula de tumor sólido o fibroblasto. Después del tratamiento de esta manera, las células resultantes pueden administrarse a (introducirse en) el individuo según métodos conocidos para los expertos en la técnica. Para inducir la expresión del producto de ácido nucleico, un agente (tal como un fármaco) que es capaz de inhibir la escisión de la ribozima de auto-escisión codificada (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas), puede administrarse al individuo según métodos conocidos para los expertos en la técnica. Dicho procedimiento de tratamiento se refiere algunas veces como tratamiento *ex vivo*. La terapia *ex vivo* se ha descrito, por ejemplo, en Kasid et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:473 (1990); Rosenberg et al., N. Engl. J. Med., 323:570 (1990); Williams et al., Nature, 310:476 (1984); Dick et al., Cell, 42:71 (1985); Keller et al., Nature, 318:149 (1985); y Anderson et al, Patente de los Estados Unidos No. 5.399.346.

En una realización particular, las construcciones de ADN de la presente invención pueden usarse en un método para expresar un producto de ácido nucleico deseado en un individuo. En este método, las células que comprenden una construcción de ADN de la presente invención se introducen en un individuo. Un agente (tal como un fármaco) que

es capaz de inhibir la escisión de la ribozima de auto-escisión codificada (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas), se administra entonces al individuo, en el que el ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado se expresa, resultando en la producción del producto. En una realización particular de este método, la construcción de ADN que comprende: (a) ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado; (b) un promotor unido de forma operativa al ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado; y (c) ADN que codifica una ribozima de auto-escisión. El ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado y el ADN que codifica la ribozima de auto-escisión están en 3' del promotor. El ADN que codifica la ribozima de auto-escisión puede estar en 5' ó 3' del ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado. La transcripción de los dos componentes de ADN en la construcción produce un ARNm que comprende la ribozima de auto-escisión y ARNm que codifica el producto de ácido nucleico deseado.

Alternativamente, en un método para expresar un producto de ácido nucleico deseado en un individuo, una construcción de ADN de la presente invención puede administrarse directamente al individuo. El modo de administración es preferiblemente en la localización de las células diana. La administración puede ser nasalmente o por inyección. Otros modos de administración (parenteral, mucosal, sistémica, implante, intraperitoneal, oral, intradérmica, transdérmica, intramuscular, intravenosa incluyendo infusión y/o inyección de bolo, subcutánea, tópica, epidural, bucal, rectal, vaginal, etc.) son generalmente conocidos en la técnica. La construcción de ADN puede, preferiblemente, administrarse en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como disolución salina, agua estéril, disolución de Ringer, o disolución isotónica de cloruro de sodio. Un agente (tal como un fármaco) que es capaz de inhibir la escisión de la ribozima de auto-escisión codificada (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas), se administra entonces al individuo, en el que el ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado se expresa, resultando en la producción del producto.

En otra realización, las construcciones de ADN de la presente invención pueden usarse en un método para modular la expresión de un producto de ácido nucleico deseado en un individuo. En este método, las células que comprenden una construcción de ADN de la presente invención se introducen en un individuo. Un efector que es capaz de unirse al resto de aptámero del complejo aptámero-ribozima de auto-escisión se administra entonces al individuo, mediante lo que la expresión del ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado puede inducirse, potenciarse, reducirse, inhibirse o regularse, dependiendo del diseño del complejo como se ha discutido anteriormente. En una realización particular de este método, la construcción de ADN que comprende: (a) ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado; (b) un promotor unido de forma operativa al ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado; y (c) ADN que codifica un complejo aptámero-ribozima de auto-escisión (por ejemplo, un resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión que comprende un aptámero injertado en el resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión en una localización de manera que la actividad de escisión del resto mutante de ARN de esquistosoma de auto-escisión puede controlarse mediante la unión de un efector al aptámero). Alternativamente, en un método para modular la expresión de un producto de ácido nucleico deseado en un individuo, una construcción de ADN de la presente invención puede administrarse directamente al individuo. Los modos de administración incluyen los descritos anteriormente. La construcción de ADN puede, preferiblemente, administrarse en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como disolución salina, agua estéril, disolución de Ringer, o disolución isotónica de cloruro de sodio. Un efector que es capaz de unirse al resto de aptámero del complejo aptámero-ribozima de auto-escisión puede administrarse entonces al individuo, mediante lo que la expresión del ADN que codifica el producto de ácido nucleico deseado puede inducirse, potenciarse, reducirse, inhibirse o regularse, dependiendo del diseño del complejo como se ha discutido anteriormente.

Los agentes y efectores pueden administrarse a un individuo en una variedad de formas. La ruta de administración depende del agente o efector particular. Las rutas de administración son generalmente conocidas en la técnica e incluyen rutas oral, intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en polímeros de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa incluyendo infusión y/o inyección en bolo, subcutánea, tópica, epidural, bucal, rectal, vaginal e intranasal. También pueden usarse otras rutas de administración adecuadas, por ejemplo, para conseguir la absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos.

La dosificación de agente, efector, construcción de ADN de la presente invención administrada a un individuo, incluyendo frecuencia de administración, variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo modo y ruta de administración; tamaño, edad, sexo, salud, peso corporal y dieta del receptor; naturaleza y grado de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se está tratando; clase de tratamiento concurrente, frecuencia de tratamiento, y el efecto deseado.

#### Composiciones farmacéuticas

En determinadas realizaciones, el agente, efector, y construcción de ADN (referidos colectivamente en la presente memoria como agentes terapéuticos) de la presente descripción se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichos agentes terapéuticos pueden administrarse solos o como un componente de una formulación farmacéutica (composición). Las secuencias de ácido nucleico recombinante (por ejemplo, construcciones de expresión) que codifican una ribozima (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas) pueden usarse en composiciones terapéuticas (o farmacéuticas) para regular la expresión de un producto de ácido nucleico diana. Las composiciones terapéuticas de la invención pueden usarse solas o mezcladas, o en combinación química, con uno o más materiales, incluyendo otros vectores recombinantes, materiales que incrementan la

estabilidad biológica de los vectores recombinantes, o materiales que incrementan la capacidad de las composiciones terapéuticas para penetrar específicamente el tipo de célula relevante. Las composiciones terapéuticas de la invención se administran en vehículos farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, disolución salina fisiológica), que se seleccionan sobre la base del modo y ruta de administración, y práctica farmacéutica estándar. Los vehículos farmacéuticos adecuados, así como las necesidades farmacéuticas para uso en formulaciones farmacéuticas, se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en este campo.

Las composiciones terapéuticas de la invención se administran en dosificaciones que se determina que son apropiadas por un experto en la técnica. Una dosificación apropiada en una que efectúa un resultado deseado, por ejemplo, una reducción en un síntoma de una enfermedad que se pretende tratar. Se espera que las dosificaciones varían, dependiendo de las características farmacocinéticas y farmacodinámicas del agente particular, y su modo y ruta de administración, así como la edad, peso, y salud del receptor; la naturaleza y grado de cualquier enfermedad relevante; la frecuencia y duración del tratamiento; el tipo, si existe, de terapia concurrente; y el efecto deseado.

Las composiciones terapéuticas de la invención pueden administrarse a un paciente por cualquier modo apropiado, por ejemplo, parenteralmente, intraperitonealmente, oralmente, tópicamente (por ejemplo, con dimetil sulfóxido), o intravenosamente, como determina el experto en la técnica. Alternativamente, puede ser necesario administrar las composiciones quirúrgicamente al tejido diana. Los tratamientos de la invención pueden repetirse según se necesite, como determina un experto en la técnica.

Puede usarse cualquier método que consiga a transferencia *in vivo* de ácidos nucleicos en células eucariotas. Por ejemplo, las construcciones de expresión de éstos pueden empaquetarse en liposomas, vectores basados en ácidos nucleicos no virales, fantasmas de eritrocitos, o microesferas (por ejemplo, micropartículas; véase, por ejemplo, Pat. U.S. Nos. 4.789.734; y 4.925.673; 3.625.214; y Gregoriadis, Drug Carriers in Biology and Medicine, p. 287-341 (Academic Press, 1979)). Además, la administración de construcciones de expresión que codifican un resto mutante de ribozima puede conseguirse por inyección directa en tejidos diana, por ejemplo, en un precipitado de fosfato de calcio o acoplado con lípidos.

La ribozima proporcionada exógenamente (natural o mutantes tales como mutantes de ribozima de esquistosomas) puede contener nucleótidos modificados, por ejemplo, nucleótidos modificados que potencian la estabilidad. Por ejemplo, los restos mutantes de ribozima pueden contener uniones inter-nucleótido distintas de enlaces fosfodiéster, tal como fosforotioato, metilfosfonato, metilfosfodiéster, fosforoditioato, fosforamidato, fosfotriéster, o uniones fosfato éster (Uhlman et al., Chem. Rev. 90(4):544-584, 1990; Tidd et al., Anticancer Research 10:1169, 1990). La capacidad de las ribozimas también puede incrementarse incorporando 3'-deoxitimidina o nucleótidos sustituidos en 2' (sustituidos con, por ejemplo, grupos alquilo) en las ribozimas durante la síntesis, proporcionando las ribozimas como derivados fenilisourea, o teniendo otras moléculas, tal como aminoacridina o poli-lisina, unidas a los extremos 3' de los snoARN (véase, por ejemplo, Tidd et al., Anticancer Research 10:1169-1182, 1990). Las modificaciones de los nucleótidos de ARN de los restos de ribozima de la invención pueden estar presentes a lo largo de las ribozimas, o en regiones seleccionadas. Los vectores de ADN que codifican restos de ribozima pueden modificarse para incrementar su capacidad de penetrar el tejido diana, por ejemplo, acoplándolos a compuestos lipofílicos. Además, los vectores de ADN pueden estar dirigidos a células particulares acoplándolos a ligandos específicos para receptores en la superficie celular de una célula diana. Los vectores de ADN también pueden estar dirigidos a tipos de células específicos conjugándolos con anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a receptores específicos de tipo de células.

Para la administración tópica, una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de los agentes terapéuticos se aplica en el sitio deseado en la piel, preferiblemente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una crema, gel, loción, o pomada fácil de extender, o un líquido tal como disolución salina. Para uso en la piel, la penetración de los ácidos nucleicos en el tejido puede conseguirse por una variedad de métodos conocidos para los expertos en este campo. Por ejemplo, las construcciones de expresión pueden incorporarse en un parche transdérmico que se aplica en la piel. Preferiblemente, la penetración que resulta de estos métodos se potencia con un agente químico de administración transdérmica tal como dimetil sulfóxido (DMSO) o el tensioactivo no iónico, n-decilmetil sulfóxido (NDMS), como se describe en Choi et al., Pharmaceutical Res., 7(11): 1099, 1990. Las dosificaciones para una cantidad terapéuticamente efectiva para aplicación tópica estarían en el intervalo de 100 ng a 10 mg por área superficial tratada por día.

#### Ejemplificación

La invención que ahora se ha descrito generalmente, se entenderá más fácilmente por referencia a los ejemplos siguientes, que se incluyen meramente para propósitos de ilustración de determinadas realizaciones y realizaciones de la presente invención, y no se pretende que limiten la invención.

Estudios recientes del control de rutas metabólicas específicas en bacterias han documentado la existencia de mecanismos completamente 'basados en ARN' para controlar la expresión génica que implican la modulación de la traducción, terminación de la transcripción, o auto-escisión del ARN a través de la interacción directa de metabolitos intracelulares específicos y secuencias de ARN (Winkler, et al, 2002, Nature 419, 952-6; Winkler, et al., 2004, Nature

428, 281-6; Mandal, et al., 2004, Nat Struct Mol Biol 11, 29-35; Cech, et al., 2004, Nature 428, 263-4). Aquí, los Solicitantes muestran que un sistema de regulación génica 'basado en ARN' análogo puede 'diseñarse' efectivamente para células de mamíferos mediante la incorporación de secuencias que codifican restos de ARN de auto-escisión (Cech, et al., 1990, Biosci Rep 10, 239-61) en la unidad transcripcional de un gen o vector. Cuando se posicionan apropiadamente, las secuencias dan lugar a la inhibición potente de la expresión génica o del vector, debido a la escisión espontánea del transcrito de ARN. La administración bien de oligonucleótidos complementarios a regiones del resto de auto-escisión, o una molécula pequeña específica resulta en la inducción eficiente de la expresión génica, debido a la inhibición de la auto-escisión del ARNm. La regulación eficiente de la expresión del transgén se muestra que es posible en una variedad de líneas celulares de mamíferos, y en animales vivos. Conjuntamente con otras tecnologías emergentes (Silverman, et al., 2003, RNA 9, 377-83), la metodología general puede ser particularmente aplicable al desarrollo de sistemas de regulación génica personalizados para cualquier molécula inductora pequeña, y proporcionar un medio nuevo para detección biológica *in vivo* que puede tener una aplicación importante en la administración regulada de terapéuticos proteicos.

La estrategia general para controlar la expresión génica mediante la modulación del procesamiento del ARN se muestra en la Fig. 1a. La estrategia depende críticamente tanto de la capacidad de una ribozima de auto-escisión específica (rz) para efectuar la escisión altamente específica (>99%) de una molécula de ARN en la que está incluida, como de la disponibilidad de una molécula pequeña capaz de inhibir eficientemente la auto-escisión de la rz que actúa en cis en un medio intracelular. Una primera etapa en nuestros estudios fue identificar secuencias rz candidatas capaces de escisión eficiente en células de mamíferos en el contexto de un vector de 'expresión'. Para este propósito, los Solicitantes usaron un ensayo de transfección transitoria que implica un vector de expresión de mamíferos estándar (Ory, et al., 1996, Proc Natl Acad Sci U S A 93, 11400-6) que codifica un informador LacZ (Fig. 1b). Las secuencias rz candidatas se introdujeron en una de un número de diferentes localizaciones en la unidad transcripcional del vector, y en paralelo, las rz mutantes inactivas correspondientes se introdujeron en los mismos sitios para proporcionar un medio para medir la eficiencia de la reducción de la expresión génica del informador. Después de la transfección de células 293 con estos vectores, se prepararon extractos de proteína de células y se cuantificó el nivel de  $\beta$ -gal. La actividad de escisión de la rz funcional en las células se midió como 'veces' de supresión en la expresión génica del informador respecto al vector con rz inactiva.

Un gran número de diferentes rz que codifican restos se eligieron para análisis, incluyendo secuencias rz naturales no manipuladas, rz que se muestra que funcionan en células de mamíferos, y rz preparadas por ingeniería por otros para poseer propiedades bioquímicas o catalíticas específicas *in vitro* (por ejemplo, alta  $K_{cat}$ , bajo requerimiento de  $Mg^{++}$ , etc.). Véase la Tabla 1 más adelante. Aunque la gran mayoría de las rz ensayadas no afectaron apreciablemente la expresión del informador, como se refleja por una casi igual expresión de LacZ por vectores que codifican rz funcionales e inactivas (definido como 'veces'=1), se identificaron dos restos de rz que parecían funcionar efectivamente: el rz Pst-3 de cabeza de martillo derivado del grillo de cueva Dolichopoda (Rojas, et al., 2000, Nucleic Acids Res 28, 4037-43) (Fig. 1c; diferencia de 13 veces entre rz funcional e inactiva) y el rz Sm1 de cabeza de martillo derivado del trematodo Schistosoma mansoni (Ferbeyre, et al., 1998, Mol Cell Biol 18, 3880-8) (Fig. 1d) en el que el tetrabucle 5'UUUCG3' se injertó en un tallo III extendido (diferencia de 19 veces). De forma interesante, ambas rz poseen estructuras únicas respecto a las otras rz de cabeza de martillo ensayadas, ya que contienen un 'tallo I' extendido con un bucle interno (véanse, las Figs 1c y 1d).

Tabla 1. Sondeo de la capacidad de diferentes ribozimas para funcionar en células de mamíferos.

Ribozima	Veces	Comandos
cabeza de martillo de Zillmen <sup>1</sup>	1	tallo II corto, funcionó a $Mg^{++}$ bajo
cabeza de martillo de Lockett <sup>2</sup>	1	tallo II corto, funcionó a $Mg^{++}$ bajo
cabeza de martillo de Szostak <sup>3</sup>	1	tallo II corto, mayor tasa catalítica
cabeza de martillo de Taira <sup>4</sup>	1	funcionó en células
cabeza de martillo de Taira incluida en ARNt <sup>4</sup>	1	el ARNt ayudó a estabilizar la ribozima
cabeza de martillo de McSwiggen <sup>5</sup>	1	funcionó en células
cabeza de martillo de Uhlenbeck <sup>6</sup>	1	tallo I corto, mayor tasa catalítica
cabeza de martillo de ABSV <sup>7</sup>	1	ribozima natural
horquilla de TRSV <sup>8</sup>	1	ribozima natural
cabeza de martillo de TRSV <sup>8</sup>	1	ribozima natural
ribozima de Neurospora <sup>9</sup>	1	ribozima natural

ribozima de virus de hepatitis delta <sup>10</sup>	1	ribozima natural
cabeza de martillo de tritón <sup>11</sup>	1	ribozima natural
cabeza de martillo de grillo <sup>12</sup>	13	ribozima natural
cabeza de martillo de Schisto <sup>13</sup>	1	ribozima natural
Schisto con nuevo bucle-III	19	ribozima natural

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

Sobre la base de su aparente mayor nivel de actividad de auto-escisión, la Sm1 rz se eligió para estudio y manipulación adicionales. En un esfuerzo para mejorar la eficiencia de la actividad de auto-escisión de Sm1 rz, se hicieron y evaluaron una serie de modificaciones de la estructura de Sm1 rz. Como se muestra en la Fig. 1d, la modificación específica en el nucleótido 7 (C a U) en el núcleo catalítico conservado (Hertel, et al., 1992, Nucleic Acids Res 20, 3252), y cambios en el tallo III distal dieron lugar a un incremento significativo en el grado de auto-escisión (la Sm1 rz modificada se denominó 'N73', hasta una diferencia de 62 veces entre rz funcional e inactiva). La transferencia de la N73 rz desde la posición A a E del vector potenció la actividad hasta 225 veces (esta rz se denominó 'N79' y se usó en los estudios posteriores). Las modificaciones adicionales en el tallo I cerca del núcleo catalítico y cerca de sitio de inserción de restricción dieron lugar a incrementos adicionales en la actividad, resultando finalmente en una diferencia global de 1.401 veces en los niveles de expresión entre rz funcional frente a inactiva (Fig. 1e).

Además de las modificaciones que dieron lugar a actividad de auto-escisión mejorada, varias modificaciones, principalmente las que implican el acortamiento del tallo I (Fig. 1f), y la alteración de nucleótidos en el bucle interno del tallo I (Fig. 1g), redujeron dramáticamente el nivel de auto-escisión. De forma interesante, ninguna de estas modificaciones afectó las secuencias de núcleo conservadas que se sabe que son requeridas para la escisión de rz *in vitro* (Ruffner, et al., 1990, Biochemistry 29, 10695-702). Bajo condiciones estándar *in vitro* de 10 mM Mg<sup>++</sup>, la medida de la actividad catalítica de la N79 rz y la N107(U a G) rz, que porta un cambio de única base U a G en el bucle I y es inactiva en células de mamíferos (Fig. 1g), indicó que ambas rz fueron igualmente funcionales *in vitro* (valores K<sub>obs</sub> de 0,84<sup>-min</sup> y 1,06<sup>-min</sup>, respectivamente, véanse Métodos Suplementarios). De forma intrigante, sin embargo, la determinación de la tasa de escisión a 0,5 mM Mg<sup>++</sup> indicó que sólo la enzima N79 poseía una actividad significativa bajo condiciones de Mg<sup>++</sup> bajo (N79 rz K<sub>obs</sub> = 0,84<sup>-min</sup> frente a N107(U a G) rz K<sub>obs</sub> = 0,014<sup>-min</sup>). Estos resultados sugieren que las secuencias en la estructura de bucle única de tallo-I de la Sm1 rz pueden permitir una auto-escisión suficiente en células de mamíferos en parte debido a que facilitan la auto-escisión a concentraciones fisiológicas de Mg<sup>++</sup>. Consistente con esta idea, la medida de la K<sub>obs</sub> de otra rz de cabeza de martillo bien caracterizada ("cabeza de martillo de McSwiggen", Tabla 1) que previamente se ha mostrado por otros que funciona en células de mamíferos, que se muestra en nuestro ensayo de transfección que no posee actividad apreciable, indicó que ocurría una actividad de escisión *in vitro* significativa sólo bajo condiciones de alto Mg<sup>++</sup> (0,32<sup>-min</sup> a 10 mM Mg<sup>++</sup> frente a 0,015<sup>-min</sup> a 0,5 mM Mg<sup>++</sup>). Permanece sin aclarar hasta qué grado la capacidad para funcionar a baja concentración de Mg<sup>++</sup> se contribuye a la capacidad de una rz para funcionar eficientemente en células de mamíferos, sin embargo, ya que varias rz preparadas por ingeniería por otros para funcionar eficientemente *in vitro* bajo condiciones de bajo Mg<sup>++</sup><sup>13,14</sup> estuvieron entre las muchas rz que se encontró que eran no funcionales en nuestro ensayo de transfección transitorio.

Los Solicitantes también encontraron que la eficiencia de ribozimas de esquistosoma era independiente de la cantidad de ADN plasmídico transfectado en células de mamíferos. Un amplio rango de concentración de ADN plasmídico se ensayó en el ensayo de transfección. Se encontró que la eficiencia de las ribozimas de esquistosoma permaneció inalterada con cantidades crecientes de ADN transfectado. Esto sugiere que la función de las ribozimas de esquistosoma es en gran medida independiente de los recursos celulares y puede acoplarse a un promotor fuerte para producir altos números de copias de ARNm regulable. Los Solicitantes ensayaron cuatro clases de promotores (promotor CMV, promotor EF1-alfa, promotor Ubiquitina C, y promotor Lenti viral) y encontraron que todos funcionaban bien con las ribozimas de esquistosoma. Como el mecanismo de las ribozimas debería ser independiente de los sistemas de promotor, los Solicitantes creen que las ribozimas de esquistosoma deberían funcionar con todos los promotores diferentes. Los Solicitantes también ensayaron cuatro clases de genes informadores (Lac-Z, GFP, dsRED, y Luciferasa) y todos funcionaron bien con las ribozimas de esquistosoma. Los Solicitantes creen que las ribozimas de esquistosoma deberían funcionar con otros genes informadores. Los Solicitantes encontraron además que las ribozimas de esquistosoma funcionaron no sólo en células transfectadas

transitoriamente, sino también en células transfectadas de forma estable. Se generaron varias líneas celulares HEK-293 estables que contienen ribozimas de esquistosoma. Estas líneas celulares se usaron posteriormente para cribar bibliotecas de compuestos pequeños que dio lugar eventualmente al descubrimiento de fármacos para la inhibición de ribozimas y así a la regulación de la expresión génica (véase más adelante).

5 Por ejemplo, además de funcionar en células 293 en el contexto del vector pMD basado en CMV original ensayado, la N79 rz también redujo dramáticamente la expresión de  $\beta$ -gal en una variedad de otras líneas celulares usadas comúnmente después de transfección (Fig. 2a). Además, la N79 rz fue capaz de funcionar eficientemente cuando se puso en otras unidades transcripcionales que usaron diferentes promotores y un gen informador diferente (eGFP) (Fig. 2b). Como los Solicitantes habían observado en el cribado primario de diferentes restos de rz para actividad en  
10 células de mamíferos, N79 fue capaz de funcionar cuando se puso en varias, pero no todas, las localizaciones de la unidad transcripcional de pMD, aunque a diferentes eficiencias (Fig. 2c). De forma importante, el posicionamiento de dos secuencias rz en tándem, en algunos casos (por ejemplo, posición E) dio lugar a una supresión dramática de la expresión génica del informador (Fig. 2c).

15 Un requerimiento esencial para el desarrollo de un sistema de regulación génica basado en la modulación de la actividad de auto-escisión es la disponibilidad de moléculas inductoras pequeñas capaces de la inhibición eficiente de la actividad de rz en células de mamíferos. En un esfuerzo para identificar dichas moléculas, los Solicitantes primero sondearon un gran número de antibióticos comunes que se había mostrado que inhibían la escisión de rz *in vitro* (Tabla 1 anterior) (Hermann, et al., 1998, J Mol Biol 276, 903-12; Jenne, et al., 2001, Nat Biotechnol 19, 56-61; Murray, et al., 1996, Biochem J 317 (Pt 3), 855-60; Stage, et al., 1995, ARN 1, 95-101; Tor, et al., 1998, Chem Biol 5, R277-83; von Ahsen, et al., 1991, Nature 353, 368-70). En ningún caso se observó una inhibición significativa de la auto-escisión por estos antibióticos en nuestro ensayo de transfección transitorio.  
20

Los Solicitantes sondearon a continuación la capacidad de diferentes tipos de oligonucleótidos antisentido (Braasch, et al., 2002, Biochemistry 41, 4503-10) para inhibir la escisión de rz (véase la Fig. 1e para la secuencia diana, SEQ ID NO: 67). Aunque la transfección con PNA, LNA, y NA "de agarre" no tuvo efectos mensurables en la actividad de auto-escisión, y los ARN derivados de fosforotioato, 2'-O-metilo, y fosforotioato 2'-O-metilo dieron lugar a una inhibición de la auto-escisión modesta (inducción de <10 veces), la transfección de un oligonucleótido morfolino (Morcos, et al., 2001, Genesis 30, 94-102) dio lugar a una inhibición fuerte de la auto-escisión de rz, como se revela por un incremento dramático en la expresión génica del informador (Fig. 3a). Aunque las 'veces' de inducción obtenidas por este método fueron algo variables de experimento a experimento (110-2.000 veces en el caso de la doble construcción N79) lo más probablemente debido a la variabilidad de la eficiencia de la administración y toxicidad del oligo asociada con la transfección del oligo, el grado de inducción de la expresión génica fue no obstante comparable con el conseguido con otros sistemas de regulación génica, y claramente representa un rango que sería útil para una variedad de entornos experimentales y clínicos. En algunos casos, los niveles absolutos de expresión génica conseguidos después de la administración de morfolino se acercaron al 50% de la inducción máxima teórica posible (es decir, el nivel de expresión génica producido por la rz inactiva), lo que sugiere que la escisión de rz puede ser eficientemente inhibida en células de mamíferos.  
25  
30  
35

Los Solicitantes generaron líneas celulares estables que portan una construcción de expresión integrada en la que un informador luciferasa se puso bajo el control de dos copias de la N79 rz, e hicieron uso de las células en estudios de cribado de alto rendimiento para identificar compuestos de molécula pequeña capaces de inhibir la auto-escisión de rz. De los compuestos identificados (Tabla 1 a continuación), se encontró que toyocamicina (Aszalos, et al., 1966, J Antibiot (Tokio) 19, 285), un análogo de nucleósido, era uno de los inhibidores más potentes de la función de rz. Como se muestra en la Fig 3b, la administración de 1,5  $\mu$ m de toyocamicina a las mismas células dio lugar a un incremento dramático en la expresión de la proteína luciferasa. Un análisis paralelo de la expresión del ARNm de luciferasa demostró que, en ausencia del fármaco, se produjo poco si algo de ARNm de luciferasa en el núcleo o citoplasma, mientras en las células tratadas con fármaco, la cantidad de ARNm de luciferasa se incrementó hasta un nivel comparable al de las células que portan rz inactiva (Fig. 3c). La ausencia de ARNm detectable en las células no tratadas sugiere que los ARNm escindidos se degradan rápidamente, presumiblemente porque los fragmentos escindidos carecen de secuencias convencionales en los extremos de los ARNm.  
40  
45

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

Nombre del compuesto	CE <sub>50</sub> (μM)	Veces <sub>máx</sub>	Clase
Toyocamicina	0,4	365	ribo-nucleósido
8-Azaadenosina	4	45	ribo-nucleósido
Sangivamicina	1	38	ribo-nucleósido
Tubercidina	2,5	58	ribo-nucleósido
Tubercidina-monofosfato cíclico	34	35	ribo-nucleósido
Tubercidina-monofosfato	2	39	ribo-nucleósido
Tubercidina-trifosfato	2	35	ribo-nucleósido
Nebularina	10	8	ribo-nucleósido
Nucleósido Tricíclico	40	12	ribo-nucleósido
5-FluoroUridina	5,9	120	ribo-nucleósido
5-BromoUridina	267	16	ribo-nucleósido
5-FluoroUracilo	200	377	pirimidina
Syto-83	7	26	agente de tinción de unión a ARN
Bromuro de homidio	2	8	agente de tinción de unión a ARN
Naranja de acridina	7	4	agente de tinción de unión a ARN

Además de toyocamicina, los compuestos 5'-FU (tal como 5'-FluoroUridina y 5'-FluoroUracilo) son otros dos inhibidores potentes de la función de rz (Tabla 2). Estos dos compuestos 5'-FU también son análogos de nucleósidos. Las Figuras 9A-9B muestran que 5'-FUridina (A) y 5'-FUracilo (B) indujeron la expresión génica mediante la inhibición de la auto-escisión de rz de una manera dependiente de la dosis. Como se muestra en las Figuras 9A y 9B, la administración de los dos compuestos 5'-FU a las células dio lugar a un incremento dramático en la expresión de la proteína luciferasa de una manera dependiente de la dosis.

A diferencia de toyocamicina, adenosina, un compuesto relacionado, no poseía capacidad de inhibir la auto-escisión de rz. Aunque los ensayos anteriores indican que la auto-escisión es altamente eficiente en la línea celular estable, la medida sensible de la actividad luciferasa por emisión de fotones indica que hay, no obstante, una cantidad extremadamente baja pero detectable de expresión de luciferasa por encima del nivel de la emisión de fondo de células control que no portan gen de luciferasa (véase la leyenda de la Fig. 3).

Habiendo documentado la capacidad del sistema de regulación basado en rz de funcionar en cultivos de células de mamíferos, un asunto importante final que debía abordarse era si la maquinaria intracelular y el 'entorno' necesario para la auto-escisión estaban operativos en células primarias *in vivo*. Para abordar este asunto, los Solicitantes generaron genomas de virus adeno-asociados (AAV) recombinantes que portaban unidades de transcripción derivadas de vectores pMD rz-luciferasa que poseían dos copias de N79 rz funcional o inactiva en la posición E y prepararon virus con alta titulación que poseían el rango huésped de AAV serotipo 5. Los dos virus se usaron entonces para inyectar ratones desnudos subretinalmente como se describe en "Métodos". Para proporcionar un medio de normalización para diferencias en la capacidad de medir la actividad luciferasa en diferentes días (tal como variaciones debidas a la administración del sustrato luciferina), también se inyectó a todos los animales en los músculos isquiotibiales de la extremidad posterior virus AAV que portaban las N79 rz inactivas. Después de 21 días, se formaron imágenes de los animales inyectados para la expresión génica de luciferasa usando el formador de imágenes Xenogen IVIS, que proporciona una medida cuantitativa de expresión de luciferasa sobre la base de la detección de fotones únicos (Contag, et al., 1998, Nat Med 4, 245-7). Inmediatamente después de la formación de imágenes, se implantó a cohortes de ratones inyectados con el virus que portaba las secuencias rz funcional bajo la piel dorsal gránulos de 'liberación en el tiempo' de siete días bien de toyocamicina o adenosina (Innovative Research of America, Inc), mientras se implantó a otra cohorte de ratones inyectados con virus que portaban las secuencias de rz inactiva gránulos de toyocamicina. Dos días después, se formaron imágenes de todos los animales para expresión de luciferasa. Las imágenes representativas de ratones en cada grupo de tratamiento, tomadas antes y después del tratamiento con fármaco, se muestran en la Fig. 4. Las imágenes demuestran que, como se esperaba,

los ratones inyectados con virus que portan rz inactivas muestran una expresión robusta de luciferasa en la retina, y la expresión fue independiente de la administración de toyocamicina (Fig. 4, panel superior). Los ratones inyectados con virus que portan dos rz funcionales e implantados con gránulos de adenosina muestran poca, si alguna, expresión génica antes o después del tratamiento con adenosina (Fig. 4, panel medio), consistente con la incapacidad de la adenosina de inhibir la auto-escisión de rz. De forma importante, los ratones inyectados con virus que portan las rz funcionales muestran una expresión fácilmente detectable sólo después del tratamiento con toyocamicina (Fig. 4, panel inferior). La cuantificación de la salida de fotones indicó que la expresión génica se 'indujo' 39, 185, y 191 veces en los tres ratones infectados con virus que portan las rz funcionales y tratados con toyocamicina. En el último caso (animal que muestra una inducción de 191 veces) la expresión génica inducida alcanzó un nivel en 40% de la expresión génica de virus que portan rz inactivas. Estos resultados indican que puede conseguirse una regulación génica mediada por rz significativa en el entorno *in vivo*. Aunque la retina puede ser particularmente accesible a 'inductor' debido a su vascularización extensa, los Solicitantes han demostrado en experimentos preliminares que la regulación génica puede conseguirse en un número de otros sitios anatómicos *in vivo* (por ejemplo, músculo y oído).

Globalmente, los estudios reportados aquí proporcionan una 'prueba de principio' importante para estrategias de regulación génica basadas en la modulación del procesamiento del ARN. Específicamente, el hecho de que la 'auto-escisión' de rz eficiente pueda hacerse ocurrir en una variedad de diferentes líneas celulares de mamíferos, y en células primarias *in vivo* sugiere que las células de mamíferos pueden ser, en general, 'permissivas' para la auto-escisión de ribozima eficiente y, por lo tanto, que los sistemas de regulación basados en rz pueden ser generalmente aplicables a la manipulación de la expresión génica en células y animales. Además de las implicaciones para el desarrollo de estrategias de regulación génica, los estudios también proporcionan una base racional convincente para determinar si los mecanismos sólo de ARN 'naturales' para la regulación génica existen en células de mamíferos.

Los sistemas usados más comúnmente para controlar la expresión génica, que se basan en la regulación de la transcripción (Gossen, et al., 1992, Proc Natl Acad Sci U S A 89, 5547-51; Rivera, et al., 1996, Nat Med 2, 1028-32; Suhr, et al., 1998, Proc Natl Acad Sci U S A 95, 7999-8004; Wang, et al., 1994, Proc Natl Acad Sci U S A 91, 8180-4) ha demostrado ser herramientas experimentales extremadamente potentes. Sin embargo, a pesar de su utilidad, dichos sistemas poseen al menos algunas limitaciones prácticas y teóricas debido a estar basados en transactivadores transcripcionales quiméricos y elementos promotores especializados. Estas limitaciones incluyen la necesidad de co-introducir construcciones de expresión tanto para el transactivador como para el transgén que se va a regular, las toxicidades potenciales debidas a la expresión de un transactivador quimérico, dificultades en la aplicación de dichos sistemas a la regulación de genes celulares endógenos debido al requerimiento de un promotor especializado, y el número limitado de moléculas inductoras pequeñas disponibles para aplicaciones experimentales y terapéuticas. A diferencia de los sistemas basados en la regulación de la transcripción, el sistema basado en rz que han descrito los Solicitantes, no requiere la expresión de ningún producto proteico transactivador y no depende del uso de ningún elemento promotor especializado, y, por lo tanto, representa, en teoría, un sistema de regulación 'portátil' que podría 'incluirse' en cualquier gen endógeno o unidad de transcripción de vector preparado por ingeniería. Aunque los dos inhibidores de la auto-escisión de rz que los Solicitantes han descrito pueden no ser ideales para muchas aplicaciones experimentales, es probable que inductores adicionales con propiedades farmacocinéticas y perfiles de toxicidad más deseables puedan identificarse mediante cribado de alto rendimiento, evaluación adicional de oligonucleótidos antisentido específicos y métodos para su administración *in vivo* a células, o a través de la aplicación de varias tecnologías emergentes. A este último respecto, los estudios recientes han mostrado que es posible generar rz cuya actividad de auto-escisión *in vitro* está controlada por un ligando específico, bien por la unión 'juiciosa' de secuencias de ARN de aptámero a regiones específicas de rz de cabeza de martillo (Breaker, et al., 2002, Curr Opin Biotechnol 13, 31-9), o a través del uso de tecnologías de evolución *in vitro* (Wilson, et al., 1999, Annu Rev Biochem 68, 611-47). La aplicación de estas tecnologías a la estrategia para controlar la expresión génica descrita aquí debería posibilitar en el futuro 'personalizar' sistemas de regulación génica basados en rz específicos a cualquier ligando de molécula pequeña. Dicha estrategia proporcionaría una metodología general para desarrollar sistemas de regulación génica que se basan en ligandos con propiedades farmacocinéticas deseables y/o específicas. Además, las tecnologías combinadas deberían proporcionar los medios para controlar independientemente y simultáneamente la expresión de múltiples productos génicos, y para expresar productos génicos en respuesta a la concentración de cualquier molécula intracelular o combinaciones de moléculas. Dicha forma de 'detección biológica' podría tener amplias aplicaciones experimentales y terapéuticas.

#### Métodos:

##### 1) Protocolo de transfección:

Se diluyeron 1,5µl de Fugene-6 (Roche, Basilea, Suiza) en 100 µl de OPTIMEM (Gibco, Carlsbad, California) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Esta disolución se añadió gota a gota a 0,45µg de ADN plasmídico y se incubó durante 15 minutos. El ADN plasmídico contiene bien una ribozima de tipo salvaje o una mutante y un gen informador LacZ. La mezcla de ADN se añadió entonces gota a gota a  $3 \times 10^5$  células HEK 293 (plaqueadas el día previo en una placa de 35 mm). Las células se recogieron para ensayo de β-galactosidasa 24 horas después de la transfección.

2) Ensayo de expresión de informador transitorio:

Los plásmidos que portaban diferentes ribozimas se transfectaron en células HEK293T y se lisaron 24h después. Los extractos de células se incubaron con ONPG, y se midió la cantidad de  $\beta$ -galactosidasa en los extractos de células mediante la cuantificación del ONPG procesado usando un luminómetro.

5 3) Ensayos para actividad ribozima:

La actividad de escisión se determinó comparando el nivel de  $\beta$ -galactosidasa medido en la muestra de ensayo con un control que comprende una mutación puntual (A  $\rightarrow$  G) en la posición 14 que atenúa la actividad de la ribozima. Brevemente, se lisaron células HEK293 transfectadas con una disolución de lisis y los extractos de células se separaron de los restos celulares. Los extractos se incubaron entonces con ONPG, un sustrato cromogénico de  $\beta$ -galactosidasa. La escisión de ONPG por  $\beta$ -galactosidasa resultó en un color amarillo. La intensidad de la emisión de luz amarilla se midió con un luminómetro (Miller J., *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York (1972)).

La mayor parte de los ensayos de los Solicitantes sobre la actividad ribozima se llevaron a cabo a nivel de proteína. Las ribozimas activas (el tipo salvaje) produjeron pocas o ninguna proteína mientras que las ribozimas inactivas (el mutante) permitió una alta producción de proteína. Los Solicitantes también llevaron a cabo análisis Northern para comparar el nivel de ARNm. Se encontró que la línea celular que contenía las ribozimas activas no tenía un nivel detectable de ARNm tanto en el núcleo como el citoplasma, comparado con el alto nivel de ARNm encontrado en las células con ribozimas inactivas. Esto es consistente con la idea de que las ribozimas actúan a nivel transcripcional.

4) Medida de la tasa catalítica:

20 Se generaron ribozimas por transcripción *in vitro* en presencia de 50  $\mu$ M de oligos bloqueantes antisentido. Las ribozimas de longitud completa se purificaron y la tasa de escisión se determinó en 50 mM Tris-HCl, pH7,5 a 23°C. Se calculó  $K_{obs}$  según la ecuación  $F_t = F_0 + F_\infty (1 - e^{-kt})$ .

5) Formación de imágenes bioluminiscentes no invasiva:

25 Antes de la formación de imágenes, se inyectaron a los ratones anestesiados 150  $\mu$ l de luciferina (30 mg/ml) y las pupilas se humedecieron y dilataron con 1% tropicamida. Se tomó una serie de imágenes bioluminiscentes durante hasta 30 minutos usando el formador de imágenes Xenogen IVIS. La producción de fotones se cuantificó en el plató del curso de tiempo usando el software LivingImage. La inducción en veces se calculó sobre la base de la producción de fotones en la retina antes y después del tratamiento con el fármaco, y se normalizó con la producción de fotones de los músculos de la pata. La adenosina se adquirió en Innovative Research of America.

30 Aunque se han discutido realizaciones específicas de la invención objeto, la especificación anterior es ilustrativa y no restrictiva.

**Listado de secuencias**

35 <110> Children's Hospital  
Mulligan, Richard  
Yen, Laising

<120> RIBOZIMAS DE AUTO-ESCISIÓN Y USOS DE ÉSTAS

40 <130> CHME-PWO-001

<140> PCT/US04/38199  
<141> 15-11-2004

45 <150> US 60/519.941  
<151> 14-11-2003

<160> 71

50 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1  
<211> 76  
<212> ARN

55 <213> Desconocido

<220>  
<223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

ES 2 638 274 T3

<400> 1  
**auguguguuc ccucugcccc gcugaugagg ucggggagac cgaaaggguc aacucuacgg 60**  
**ggcuauuaca ugcaau 76**

5 <210> 2  
 <211> 75  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido

10 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 2  
**cugagaugca gguacaucca gcugacgagu cccaaauagg acgaaacgcg cguccuggau 60**  
**uccacugcua uccac 75**

15 <210> 3  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido

20 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 <400> 3  
**cugagaugca gguacaucca gcugacgagu cccaaauagg acgaaacgcc uucggguguc 60**  
**cuggaucca cugcuaacca c 81**

25 <210> 4  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido

30 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 4  
**cugagaugca gguacaucca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcc uucggguguc 60**  
**cuggaucca cugcuaacca c 81**

35 <210> 5  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido

40 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 5  
**cugagaugca gguacaucca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**uccuggauuc cacugcuauc cac 83**

45 <210> 6  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido

50 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

55 <400> 6  
**cugagaugca gguacaucca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**uccuggauuc cacugcuauc cac 83**

ES 2 638 274 T3

<210> 7  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 5 <213> Desconocido  
  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
  
 10 <400> 7  
**cugaugca gguacaucc acugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucugggauuc cacugcuauc cac 83**  
  
 <210> 8  
 <211> 83  
 15 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
  
 20 <400> 8  
**cugaugca gguacaucc acugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucugggauuc cacugcuauc cac 83**  
  
 <210> 9  
 <211> 83  
 25 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
  
 <220>  
 30 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
  
 <400> 9  
**cugaugca gguacaucca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**uccuggauuc cacugcuauc cac 83**  
  
 35 <210> 10  
 <211> 65  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
  
 40 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
  
 <400> 10  
**agguacaucc agcugaugag uccaaauag gacgaaacgc gcuucggugc guccuggauu 60**  
**ccacu 65**  
  
 45 <210> 11  
 <211> 49  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
  
 50 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
  
 <400> 11  
 55 **ccagcugaug aguccaaau aggacgaaac gcgcuucggu gcguccugg 49**  
  
 <210> 12  
 <211> 83  
 <212> ARN

<213> Desconocido  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

5 <400> 12  
**cugaggugca gguacaucca gcugacgagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**uccuggauuc cacugcuauc cac 83**

<210> 13  
 <211> 75  
 10 <212> ARN  
 <213> Desconocido

<220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

15 <400> 13  
**cugagaugca gguacaucca gcugacgagu cccaaauagg acgaaacgcg cguccuggau 60**  
**uccacugcua uccac 75**

<210> 14  
 20 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido

<220>  
 25 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 14  
**cugagaugca gguacaucca gcugacgagu cccaaauagg acgaaacgcc uucggggcguc 60**  
**cuggauucca cugcuaucca c 81**

<210> 15  
 30 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido

<220>  
 35 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 15  
**cugagaugca gguacaucca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcc uucggggcguc 60**  
**cuggauucca cugcuaucca c 81**

<210> 16  
 40 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido

<220>  
 45 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 16  
**cugagaugca gguacaucca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**uccuggauuc cacugcuauc cac 83**

<210> 17  
 50 <211> 83  
 <212> ARN  
 55 <213> Desconocido

<220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

ES 2 638 274 T3

<400> 17  
**cugagaugca gguacaacca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**uccuggauuc cacugcuauc cac 83**

5 <210> 18  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido

10 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 18  
**cugagaugca gguacaucucc acugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucugggauuc cacugcuauc cac 83**

15 <210> 19  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido

20 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 19  
**cugagaugca gguacaucucc acugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucugggauuc cacugcuauc cac 83**

25 <210> 20  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido

30 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 20  
**cugagaugca gguacaacca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcc uucgggugcg 60**  
**cuggauucca cugcuaucca c 81**

35 <210> 21  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido

40 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

45 <400> 21  
**cugagaugca gguacaacca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcc uucgggugcg 60**  
**cuggauucca cugcuaucca c 81**

<210> 22  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido

50 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

55 <400> 22

ES 2 638 274 T3

**cugagaugca gguacaucca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcc uucgggcgua 60**  
**cuggauucca cugcuaucca c 81**  
 <210> 23  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 5 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 10 <400> 23  
**cugagaugca gguacaucca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcc uucgggcgua 60**  
**cuggauucca cugcuaucca c 81**  
 <210> 24  
 <211> 80  
 15 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 20 <400> 24  
**cugagaugca gguacaucca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcc ucgggccucc 60**  
**uggauuccac ugcuauccac 80**  
 <210> 25  
 <211> 81  
 25 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
 <220>  
 30 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 <400> 25  
**cugagaugca gguacaucca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcc uucggggccug 60**  
**cuggauucca cugcuaucca c 81**  
 35 <210> 26  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
 40 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 <400> 26  
**cugagaugca gguacaucca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcc uucggggccuu 60**  
**cuggauucca cugcuaucca c 81**  
 45 <210> 27  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
 50 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 <400> 27  
**cugagaugca gguacaucca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcc uucggggccua 60**  
**cuggauucca cugcuaucca c 81**  
 55

ES 2 638 274 T3

<210> 28  
 <211> 79  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
 5  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 <400> 28  
 10 **cugagaugca gguacaucca gcugaugagu ccuucgggac gaaacgccuu cgggcguccu 60**  
**ggauuccacu gcuauccac 79**  
 <210> 29  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 15 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 20 <400> 29  
**cugagaugca gguacaucca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**uccuggauuc cacugcuauc cac 83**  
 <210> 30  
 <211> 126  
 <212> ARN  
 25 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 30 <400> 30  
**cugagaugca gguacaucca gcugaugagu ccuaaaacau accagauuuc gaucuggaga 60**  
**ggugaagaau ucgaccaccu aggacgaaac gcgcuucggu gcguccugga uuccacugcu 120**  
**auccac 126**  
 <210> 31  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 35 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 40 <400> 31  
**cugagaugca gguacaucca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcc cuucggggcgu 60**  
**ccuggauucc acugcuaucc ac 82**  
 <210> 32  
 <211> 82  
 45 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 50 <400> 32  
**cugagaugca gguacaucca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcc uuucggggcgu 60**  
**ccuggauucc acugcuaucc ac 82**  
 <210> 33  
 55 <211> 82  
 <212> ARN

<213> Desconocido

<220>

<223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

5

<400> 33

**cugaugca gguacaacca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcc auucgggcg 60**  
**ccuggauucc acugcuauc ac 82**

<210> 34

10 <211> 82

<212> ARN

<213> Desconocido

<220>

15 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 34

**cugaugca gguacaacca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcc guucgggcg 60**  
**ccuggauucc acugcuauc ac 82**

<210> 35

20 <211> 83

<212> ARN

<213> Desconocido

<220>

25 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 35

**cugaggugca gguacaucac acugacgagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucugggauuc cacugcuauc cac 83**

<210> 36

30 <211> 83

<212> ARN

<213> Desconocido

<220>

35 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 36

**cugaggugca gguacaucac acugacgagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucugggauac cacugcuauc cac 83**

40

<210> 37

<211> 83

<212> ARN

<213> Desconocido

45

<220>

<223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 37

**cugaggugca gguacaucac acugacgagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucugggauc cacugcuauc cac 83**

50

<210> 38

<211> 83

<212> ARN

55 <213> Desconocido

<220>

ES 2 638 274 T3

<223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 38

**cugaggugca gguacaucce acugacgagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucugggaugc cacugcuauc cac 83**

5

<210> 39

<211> 83

<212> ARN

<213> Desconocido

10

<220>

<223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 39

**cugaggugca gguacaucce acugacgagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucugggauua cacugcuauc cac 83**

15

<210> 40

<211> 83

<212> ARN

<213> Desconocido

20

<220>

<223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 40

**cugaggugca gguacaucce acugacgagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucugggauug cacugcuauc cac 83**

25

<210> 41

<211> 83

<212> ARN

<213> Desconocido

30

<220>

<223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

35

<400> 41

**cugaggugca gguacaucce acugacgagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucugggauuu cacugcuauc cac 83**

<210> 42

<211> 83

<212> ARN

<213> Desconocido

40

<220>

<223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

45

<400> 42

**cugaggugca gguacaucce acugacgagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucugggauuc aacugcuauc cac 83**

<210> 43

<211> 83

<212> ARN

<213> Desconocido

50

<220>

<223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

55

<400> 43

ES 2 638 274 T3

**cugaggugca gguacaucce acugacgagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucugggauuc gacugcuauc cac 83**  
 <210> 44  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 5 <213> Desconocido  
  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
  
 10 <400> 44  
**cugaggugca gguacaucce acugacgagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucugggauuc uacugcuauc cac 83**  
  
 <210> 45  
 <211> 82  
 15 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
  
 20 <400> 45  
**cugaccagau gguacaucce gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**uccuggauuc cacaucuggc ac 82**  
  
 <210> 46  
 25 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
  
 <220>  
 30 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
  
 <400> 46  
**cugaccagau gguacaucce gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**uccuggauuc uacaucuggc ac 82**  
  
 35 <210> 47  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
  
 40 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
  
 <400> 47  
**cugauguca gguacaucce gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**uccuggauuc cacugcuauc cac 83**  
  
 45 <210> 48  
 <211> 65  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
  
 50 <220>  
  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 <400> 48  
**agguacauc agcugaugag uccaaauag gacgaaacgc gcuucggugc guccuggauu 60**  
**ccacu 65**  
 55

ES 2 638 274 T3

<210> 49  
 <211> 49  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
 5  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 <400> 49  
 10 **ccagcugaug agucccaau aggacgaaac gcgcuucggu gcguccugg 49**  
 <210> 50  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 15 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 20 <400> 50  
**cugagaugca gguacaucca ucugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucauggauuc cacugcuauc cac 83**  
 <210> 51  
 <211> 83  
 25 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 30 <400> 51  
**cugagaugca gguacauccc ucugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucagggauuc cacugcuauc cac 83**  
 <210> 52  
 <211> 83  
 35 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 40 <400> 52  
**cugagaugca gguacaucccu acugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucuaggauuc cacugcuauc cac 83**  
 <210> 53  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
 45 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 50 <400> 53  
**cugagaugca gguacaucccc acugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucugggauuc cacugcuauc cac 83**  
 <210> 54  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
 55

ES 2 638 274 T3

<220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 54  
 5 **cugagaugca gguacauccg ucugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucacggauuc cacugcuauc cac 83**

<210> 55  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 10 <213> Desconocido

<220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 55  
 15 **cugaccagau gguacaucca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**uccuggauuc cacaucuggc ac 82**

<210> 56  
 <211> 82  
 20 <212> ARN  
 <213> Desconocido

<220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 56  
 25 **cugaccaggu gguacaucca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**uccuggauuc cacaucuggc ac 82**

<210> 57  
 <211> 82  
 30 <212> ARN  
 <213> Desconocido

<220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 57  
 35 **cugaccaggu gguacauccc ucugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucagggauuc cacaucuggc ac 82**

<210> 58  
 <211> 82  
 40 <212> ARN  
 <213> Desconocido

<220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<400> 58  
 45 **cugaccaggu gguacauccc acugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucugggauuc cacaucuggc ac 82**

<210> 59  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido

<220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

ES 2 638 274 T3

<400> 59  
**cugaggugca gguacaucca gcugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**uccuggauuc cacugcuauc cac 83**  
 <210> 60  
 <211> 83  
 5 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 10 <400> 60  
**cugaggugca gguacauccc acugaugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**ucugggauuc cacugcuauc cac 83**  
 <210> 61  
 15 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
 <220>  
 20 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 <400> 61  
**cugaggugca gguacaucca gcuggugagu cccaaauagg acgaaacgcg cuucggugcg 60**  
**uccuggauuc cacugcuauc cac 83**  
 25 <210> 62  
 <211> 114  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
 30 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 <400> 62  
**gccuaaaaca uaccagaugg uacauccagc ugaugagucc caaaauaggac gaaacgcgcu 60**  
**ucggugcguc cuggauucca caucuggaga ggugaagaau ucgaccaccu aggc 114**  
 35 <210> 63  
 <211> 78  
 <212> ARN  
 40 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 45 <400> 63 \_ \_  
**cugagaugcu uuacgcgucu gaugaguccc aaauaggacg aaacgcgcuu cggugcguca 60**  
**cgcguguug cuauccac 78**  
 <210> 64  
 <211> 73  
 50 <212> ARN  
 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada  
 55 <221> característica\_misc  
 <222> 25, 49  
 <223> n= A, U, C o G

# ES 2 638 274 T3

<400> 64

cugagaugca gguacaucag cugangaguc ccaaauagga cgaaacgcng gguccugauu 60  
ccacugcauc cac 73

- 5 <210> 65  
<211> 76  
<212> ARN  
<213> Desconocido

- 10 <220>  
<223> secuencia parcial de ribozima de esquistosoma modificada

<221> característica\_misc

<222> 25

- 15 <223> n= A, U, C o G

<400> 65

cugagaugca gguacaucag cugangaguc ccaaauagga cgaaacgcuu cgggguccug 60  
auuccacugc auccac 76

- 20 <210> 66  
<211> 7.684  
<212> ADN  
<213> Desconocido

- 25 <220>  
<223> secuencia de nucleótidos del vector HDM-nLacZ

<400> 66

agcttggccc	attgcatacg	ttgtatccat	atcataatat	gtacatttat	attggctcat	60
gtccaacatt	accgccatgt	tgacattgat	tattgactag	ttattaatag	taatcaatta	120
cggggtcatt	agttcatagc	ccatataatg	agttccgcgt	tacataactt	acggtaaagt	180
gcccgcctgg	ctgaccgccc	aacgaccccc	gccattgac	gtcaataatg	acgtatgttc	240
ccatagtaac	gccaataggg	actttccatt	gacgtcaatg	ggtggagtat	ttacggtaaa	300
ctgcccactt	ggcagtacat	caagtgtatc	atatgccaa	tacgccccct	attgacgtca	360
atgacggtaa	atggccccgc	tggcattatg	cccagtacat	gaccttatgg	gactttccta	420
cttggcagta	catctacgta	ttagtcatcg	ctattaccat	ggtgatgcgg	tttggcagt	480
acatcaatgg	gcgtggatag	cggtttgact	cacggggatt	tccaagtctc	caccccattg	540
acgtcaatgg	gagtttgttt	tggcaccaaa	atcaacggga	ctttccaaaa	tgtcgtaaca	600
actccgcccc	attgacgcaa	atgggcggta	ggcgtgtacg	gtgggaggtc	tatataagca	660
gagctcgttt	agtgaaccgt	cagatcgctt	ggagacgcca	tccacgctgt	tttgacctcc	720
atagaagaca	cggggaccga	tccagcctcc	cctcgaagct	gatcctgaga	acttcagggt	780
gagtctatgg	gacccttgat	gttttctttc	cccttctttt	ctatggttaa	gttcatgtca	840
taggaagggg	agaagtaaca	gggtacacat	attgaccaa	tcagggtaat	tttgcatttg	900
taattttaaa	aaatgctttc	ttcttttaat	atactttttt	gtttatctta	tttctaatac	960
ttccctaat	ctctttcttt	cagggcaata	atgatacaat	gtatcatgcc	tctttgcacc	1020
attctaaaga	ataacagtga	taattttctg	gttaaggcaa	tagcaatatt	tctgcatata	1080
aatattttctg	catataaatt	gtaactgatg	taagagggtt	catattgcta	atagcagcta	1140
caatccagct	accattctgc	ttttatttta	tggttgggat	aaggctggat	tattctgagt	1200
ccaagctagg	cccttttgct	aatcatgttc	atacctctta	tcttcctccc	acagctcctg	1260
ggcaacgtgc	tggctctgtg	gctggcccat	cactttggca	aagaattccg	cgggcggccg	1320
ccatggcgcc	aaaaagaag	agaaaggtaa	agatccccg	gaattcactg	gcgctcgttt	1380
tacaagctcg	tgactgggaa	aacctggcg	ttaccaact	taatcgctt	gcagcacatc	1440
cccctttcgc	cagctggcgt	aatagcgaag	aggcccgcac	cgatcgccct	tcccaacagt	1500
tgcgagcct	gaatggcgaa	tggcgctttg	cctggtttcc	ggcaccagaa	gcggtgccgg	1560
aaagctggct	ggagtgcgat	cttcctgagg	ccgatactgt	cgctgcctcc	tcaaactggc	1620
agatgcacgg	ttacgatgcg	cccactaca	ccaacgtgac	ctatcccatt	acgggtcaatc	1680
cgccgtttgt	tcccacggag	aatccgacgg	gttgttactc	gctcacattt	aatggtgatg	1740
aaagctggct	acaggaaggc	cagacgcgaa	ttatttttga	tggcgtaaac	tcggcgtttc	1800
atctgtgggtg	caacggggcg	tgggtcgggt	acggccagga	cagtcgtttg	ccgtctgaat	1860
ttgacctgag	cgcattttta	cgcgcgggag	aaaaccgcct	cgcggtgatg	gtgctgcgct	1920
ggagtgcagg	cagttatctg	gaagatcagg	atatgtggcg	gatgagcggc	attttccgtg	1980
acgtctcggt	gctgcataaa	ccgactacac	aaatcagcga	tttccatggt	gccactcgct	2040
ttaatgatga	tttcagccgc	gctgtactgg	aggctgaagt	tcagatgtgc	ggcgagttgc	2100
gtgactacct	acgggtaaca	gtttctttat	ggcaggggtg	aacgcaggtc	gccagcggca	2160
ccgcgccttt	cggcggtgaa	attatcgatg	agcgtgggtg	ttatgccgat	cgcgtcacac	2220
tacgtctgaa	cgtcgaaaac	ccgaaactgt	ggagcgcgca	aatcccgaat	ctctatcgty	2280
cggtggttga	actgcacacc	gccgacggca	cgctgattga	agcagaagcc	tgcatgtctg	2340
gtttccgcga	ggtgoggatt	gaaaatggtc	tgctgctgct	gaacggcaag	ccgttgctga	2400
ttcgaggcgt	taaccgtcac	gagcatcatc	ctctgcatgg	tcaggtcatg	gatgagcaga	2460
cgatgggtgca	ggatatacctg	ctgatgaagc	agaacaactt	taacgccctg	cgtgtctcgc	2520
attatccgaa	ccatccgctg	tggtagacgc	tgtgcgaccg	ctacggcctg	tatgtggtgg	2580
atgaagccaa	tattgaaacc	cacggcatgg	tgccaatgaa	tcgtctgacc	gatgatccgc	2640
gctggctacc	ggcgatgagc	gaacgcgtaa	cgcgaatggt	gcagcgcgat	cgtaatcacc	2700
cgatgtgat	catctggctg	ctggggaatg	aatcaggcca	cggcgctaat	cacgacgcgc	2760
tgtatcgctg	gatcaaatct	gtcgatcctt	cccgcgggt	gcagtatgaa	ggcggcggag	2820
ccgacaccac	ggccaccgat	attatttgcc	cgatgtacgc	gcgcgtggat	gaagaccagc	2880
ccttcccggc	tgtgcccga	tggccatca	aaaaatggct	ttcgctacct	ggagagacgc	2940
gcccgtgat	cctttgcgaa	tacgcccacg	cgatgggtaa	cagtcttggc	ggtttcgcta	3000
aatactggca	ggcgtttcgt	cagtatcccc	gtttacaggg	cggcttcgct	tgggactggg	3060
tggatcagtc	gctgattaaa	tatgatgaaa	acggcaacc	gtggctcggct	tacggcggty	3120
atthttggcga	tacgcccgaac	gatcgccagt	tctgtatgaa	cggctctggct	tttgccgacc	3180
gcacgcccga	tccagcgtctg	acggaagcaa	aacaccagca	gcagtttttc	cagttccgct	3240
tatccgggca	aaccatcgaa	gtgaccagcg	aatacctggt	ccgtcatagc	gataacgagc	3300
tcttgcactg	gatgggtggc	ctggatggta	agccgctggc	aagcgggtgaa	gtgectctgg	3360
atgtcgctcc	acaaggtaaa	cagttgattg	aactgcctga	actaccgcag	ccggagagcg	3420
ccgggcaact	ctggctcaca	gtacgcgtag	tgcaaccgaa	cgcgaccgca	tggtcagaag	3480

ccgggacacat	cagcgcoctgg	cagcagtggc	gtctggcgga	aaacctcagt	gtgacgctcc	3540
ccgccgcgctc	ccacgccatc	ccgcactctga	ccaccagcga	aatggatttt	tgcacgcagc	3600
tgggtaataa	gcgttggcaa	tttaaccgcc	agtcaggctt	tctttcacag	atgtggattg	3660
gcgataaaaa	acaactgctg	acgccctgc	gcgatcagtt	caccctgca	ccgctggata	3720
acgacattgg	cgtaagtga	gcgaccgca	ttgaccctaa	cgcoctgggtc	gaacgctgga	3780
aggcggcggg	ccattaccag	gccgaagcag	cgttgttgca	gtgcacggca	gatacacttg	3840
ctgatcggt	gctgattacg	accgctcacg	cgtggcagca	tcaggggaaa	accttattta	3900
tcagccggaa	aacctaccgg	attgatggta	gtgggtcaaat	ggcgattacc	gttgatggtg	3960
aagtggcgag	cgatacacog	catccggcgc	ggattggcct	gaactgccag	ctggcgcagg	4020
tagcagagcg	ggtaaactgg	ctcggattag	ggccgcaaga	aaactatccc	gaccgcctta	4080
ctgccgcctg	ttttgaccgc	tgggatctgc	cattgtcaga	catgtatacc	ccgtacgtct	4140
tcccagagcga	aaacggctctg	cgctgcggga	cgcgcaatt	gaattatggc	ccacaccagt	4200
ggcgcggcga	cttccagttc	aacatcagcc	gctacagtca	acagcaactg	atggaaacca	4260
gccatcgcca	tctgctgcac	gcggaagaag	gcacatggct	gaatatcgac	ggtttccata	4320
tggggattgg	tggcgacgac	tcoctggagcc	cgtcagtatc	ggcggaaatc	cagctgagcg	4380
ccggctcgcta	ccattaccag	ttggctctggt	gtcaaaaata	ataataaccg	ggcagggggg	4440
atccaagctt	atcgataccg	tcgacctcga	gggccagat	ctaattcacc	ccaccagtgc	4500
aggctgccta	tcagaaagtg	gtggctggtg	tggctaatgc	cctggcccac	aagtatcact	4560
aagctcgctt	tcttgcctgc	caatttctat	taaaggttcc	tttgttccct	aagtccaact	4620
actaaactgg	gggatattat	gaagggcctt	ccggagcatc	tggattctgc	ctaataaaaa	4680
acatttattt	tcattgcaat	gatgtattta	aattatttct	gaatatttta	ctaaaaaggg	4740
aatgtgggag	gtcagtgcat	ttaaaacata	aagaaatgaa	gagctagttc	aaaccttggg	4800
aaaatacact	atatcttaaa	ctccatgaaa	gaaggtgagg	ctgcaaacag	ctaattgcaca	4860
ttggcaacag	cccctgatgc	ctatgcctta	ttcatccctc	agaaaaggat	tcaggtagag	4920
gcttgatttg	gaggttaaag	ttttgctatg	ctgtatttta	cattacttat	tgttttagct	4980
gtcctcatga	atgtcttttc	actaccatt	tgttatcct	gcactctca	gccttgactc	5040
cactcagttc	tcttgccttag	agataccacc	tttcccctga	agtgttccct	ccatgtttta	5100
cggcgatag	gtttctcctc	gcctggccac	tcagccttag	ttgtctctgt	tgtcttatag	5160
aggctactct	gaagaaggaa	aaacaggggg	catggtttga	ctgtcctgtg	agcccttctt	5220
ccctgcctcc	cccactcaca	gtgaccggga	atccctcgac	atggcagctc	agatcattct	5280
tgaagacgaa	agggcctcgt	gatacgccta	tttttatagg	ttaatgtcat	gataataatg	5340
gtttcttaga	cgtcagggtg	cacttttcgg	ggaaatgtgc	gcggaacccc	tatttgttta	5400
ttttctaaa	tacattcaaa	tatgtatccg	ctcatgagac	aataaccctg	ataaatgctt	5460
caataatatt	gaaaaaggaa	gagtatgagt	attcaacatt	tccgtgtcgc	ccttattccc	5520
ttttttgcgg	cattttgcct	tcoctgtttt	gctcaccag	aaacgctggg	gaaagtaaaa	5580
gatgctgaag	atcagttggg	tgcacgagtg	ggttacatcg	aactggatct	caacagcggg	5640
aagatccttg	agagttttcg	ccccgaagaa	cgttttccaa	tgatgagcac	ttttaaagtt	5700
ctgctatgtg	gcgcgggtat	atcccgtatt	gacgccgggc	aagagcaact	cggctgccgc	5760
atacactatt	ctcagaatga	cttggttgag	tactcaccag	tcacagaaaa	gcactcttacg	5820
gatggcatga	cagtaagaga	attatgcagt	gctgccataa	ccatgagtga	taacactgcg	5880
gccaaacttac	ttctgacaac	gatcggagga	ccgaaggagc	taaccgcttt	tttgcaaac	5940
atgggggatc	atgtaactcg	ccttgatcgt	tgggaaccgg	agctgaatga	agccatacca	6000
aacgacgagc	gtgacaccac	gatgcctgta	gcaatggcaa	caacgttgcg	caaactatta	6060
actggcgaac	tacttactct	agcttcccgg	caacaattaa	tagactggat	ggaggcggat	6120
aaagttgcag	gaccacttct	gcgctcggcc	cttccggctg	gctggtttat	tgctgataaa	6180
tctggagccg	gtgagcgtgg	gtctcgcggt	atcattgcag	cactggggcc	agatggtaag	6240
ccctcccgtg	tcgtagttat	ctacacgacg	gggagtcagg	caactatgga	tgaacgaaat	6300
agacagatcg	ctgagatagg	tgcoctcactg	attaagcatt	ggtaactgtc	agaccaagtt	6360
tactcatata	tacttttagat	tgatttaaaa	cttcaatttt	aatttaaaag	gatctagggtg	6420
aagatccttt	ttgataactc	catgaccaa	atccctaac	gtgagttttc	gttccactga	6480
gcgtcagacc	ccgtagaaaa	gatcaaaagga	tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	6540
atctgctgct	tgcaaacaaa	aaaaccaccg	ctaccagcgg	tggtttgttt	gccggatcaa	6600
gagctaccaa	ctctttttcc	gaaggtaact	ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	6660
gttcttctag	tgtagccgta	gttaggccac	cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	6720
tacctcgctc	tgctaactct	gttaccagtg	gctgctgcca	gtggcgataa	gtcgtgtctt	6780
accgggttgg	actcaagacg	atagttaccg	gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	6840
ggttcgtgca	cacagcccag	cttggagcga	acgacctaca	ccgaactgag	atacctacag	6900
cgtgagctat	gagaaaagcgc	cacgcttccc	gaaggagaa	aggcggacag	gtatccggtg	6960
agcggcaggg	tcggaacagg	agagcgcacg	agggagcttc	cagggggaaa	cgcoctggtat	7020
ctttatagtc	ctgtcgggtt	tcgccacctc	tgacttgagc	gtcgattttt	gtgatgctcg	7080
tcagggggggc	ggagcctatg	gaaaaacgcc	agcaacggat	gcgcccgcgtg	cggctgctgg	7140
agatggcgga	cgcgatggat	atgttctgcc	aagggttggt	ttgcgcattc	acagttctcc	7200

gcaagaattg attggctcca attcttggag tggatgaatcc gttagcgagg tgccgccggc 7260  
 ttccattcag gtcgaggtgg cccggctcca tgcaccgca cgcaacgagg ggaggcagac 7320  
 aaggtatagg gcggcgcta caatccatgc caaccggtc catgtgctcg ccgaggcggc 7380  
 ataaatcccc gtgacgatca gcggtccaat gatcgaagt aggctggtaa gagccgcgag 7440  
 cgatccttga agctgtccct gatggctcgc atctacctgc ctggacagca tggcctgcaa 7500  
 cgcgggcatc ccgatgccgc cggaaagcag aagaatcata atggggaagg ccatccagcc 7560  
 tcgctcggg gagctttttg caaaagccta ggctccaaa aaagcctcct cactacttct 7620  
 ggaatagctc agaggccgag gcggcctcgg cctctgcata aataaaaaaa attagtcagc 7680  
 catg 7684

<210> 67  
 <211> 26  
 <212> ARN  
 <213> Desconocido

5

<220>  
 <223> secuencia de nucleótidos de ribozima que es diana de oligonucleótidos antisentido

10 <400> 67

**gugcguccug gauuccacug cuaucc 26**

<210> 68  
 <211> 166  
 <212> ARN  
 <213> Neurospora

15

<400> 68

**ugcgaagggc gucgucgcc cgagcgguag uaagcagggg acucaccucc aauuugagua 60**  
**cugaaauugu cguagcaguu gacuacuguu augugauugg ugaggcuaag ugacgguaau 120**  
**ggcguaaguc aguauugcag cacagcacia gcccgcuugc gagaau 166**

20

<210> 69  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> Grillo

25

<400> 69

**caugaugugu guuccucug ccccgugau gaggucaggg aagaccgaaa gugucgacuc 60**  
**uacggggcua uaacaugcaa uggugg 86**

30

<210> 70  
 <211> 62  
 <212> ARN  
 <213> Virus de mancha anillada de tabaco

<400> 70

**auaccuguc accggaugug cuuuccgguc ugaugagucc gugaggacga aacaggacug 60**  
**uc 62**

35

<210> 71  
 <211> 75  
 <212> ARN  
 <213> Esquistosoma

40

<400> 71

**cugagaugca gguacaacca gcugacgagu cccaaauagg acgaaacgcg cguccuggau 60**  
**uccacugcua uccac 75**

## REIVINDICACIONES

1. Una ribozima de auto-escisión, que comprende (a) una secuencia de una ribozima de *Schistosoma mansoni* de tipo salvaje de SEQ ID NO: 2, y (b) un bucle adicional de 3-40 nucleótidos insertado entre dos nucleótidos en las posiciones de nucleótidos 46 a 53 de SEQ ID NO: 2.
- 5 2. La ribozima de auto-escisión de la reivindicación 1, en la que el bucle adicional se inserta entre la posición de nucleótido 49 y la posición de nucleótido 50 en SEQ ID NO: 2 y el bucle adicional comprende o consiste en la secuencia de 5'-UUCG-3', 5'-CUUCGG-3', ó 5'-GCUUCGGU-3'.
3. La ribozima de auto-escisión como se define en la reivindicación 2, que comprende además una sustitución de un U por la C en la posición de nucleótido 26 en SEQ ID NO: 2.
- 10 4. La ribozima de auto-escisión como se define en la reivindicación 2, en la que la ribozima comprende además una o más de:
  - una sustitución de una C por la A en la posición de nucleótido 20 en SEQ ID NO: 2;
  - una sustitución de una A por la G en la posición de nucleótido 21 en SEQ ID NO: 2;
  - una sustitución de un U por la C en la posición de nucleótido 55 en SEQ ID NO: 2; y
  - 15 una sustitución de una G por el U en la posición de nucleótido 56 en SEQ ID NO: 2.
5. Un ácido nucleico que codifica una ribozima de auto-escisión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Un ácido nucleico que codifica (i) una ribozima de auto-escisión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y (ii) un aptámero en una posición de manera que la actividad de escisión de dicha ribozima de auto-escisión puede modularse por la unión de un efector al aptámero
- 20 7. Una molécula de polinucleótido recombinante que comprende:
  - (a) un promotor;
  - (b) un ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico; y
  - (c) un ácido nucleico que codifica una ribozima de auto-escisión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) están unidos de forma operativa al promotor, y la transcripción del ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) produce una molécula de ARN que comprende dicha ribozima de auto-escisión y un ARNm que codifica dicho producto de ácido nucleico, en el que dicha ribozima de auto-escisión es capaz de escindir dicha molécula de ARN intramolecularmente; y opcionalmente en el que:
    - 25 (i) el ácido nucleico de (c) comprende además un ácido nucleico que codifica un aptámero que está en una posición de manera que la actividad de escisión de la ribozima de auto-escisión es regulable por la unión de un efector al aptámero;
    - 30 (ii) el ácido nucleico de (c) codifica al menos dos ribozimas de auto-escisión;
    - (iii) la molécula de polinucleótido recombinante está presente en el genoma de una célula; o
    - (iv) la molécula de polinucleótido recombinante está presente en un vector.
8. Una célula huésped aislada:
  - 35 (a) transformada con el ácido nucleico de la reivindicación 5; o
  - (b) que comprende la molécula de polinucleótido recombinante de la reivindicación 7; y en cuyo caso opcionalmente:
    - (i) en el que la célula es una célula de mamíferos; o
    - (ii) en el que la célula comprende además un agente que inhibe la escisión de la ribozima de auto-escisión, en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en: inhibidores aminoglicósido, toyocamicina, 8-azaadenosina, sangivamicina, tubercidina, tubercidina-monofosfato cíclico, tubercidina-monofosfato, tubercidina-trifosfato, nebularina, nucleósido tricíclico, 5-fluorouridina, 5-bromouridina, 5-fluorouracilo, Syto-83, bromuro de homidio, naranja de acridina, y un oligonucleótido antisentido de dicha ribozima de auto-escisión.
    - 40
9. Un vector viral o virus, que comprende:
  - (a) un promotor;
  - 45 (b) un ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico;

- (c) un ácido nucleico que codifica una ribozima de auto-escisión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) están unidos de forma operativa al promotor, y la transcripción del ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) produce una molécula de ARN que comprende dicha ribozima de auto-escisión y un ARNm que codifica dicho producto de ácido nucleico, en el que dicha ribozima de auto-escisión es capaz de escindir dicha molécula de ARN intramolecularmente.
- 5
10. Un vector viral o un virus, que comprende:
- (a) un promotor;
- (b) un ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico;
- (c) un ácido nucleico que codifica una ribozima de auto-escisión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) están unidos de forma operativa al promotor, y la transcripción del ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) produce una molécula de ARN que comprende dicha ribozima de auto-escisión y un ARNm que codifica dicho producto de ácido nucleico, en el que dicha ribozima de auto-escisión es capaz de escindir dicha molécula de ARN intramolecularmente; en el que el ácido nucleico de (c) comprende además un ácido nucleico que codifica un aptámero que está en una posición de manera que la actividad de escisión de dicha ribozima de auto-escisión es regulable por la unión de un efector a dicho aptámero.
- 10
- 15
11. Un método *in vitro* para inducir la expresión de un producto de ácido nucleico en una célula huésped aislada, que comprende poner en contacto dicha célula huésped con un agente que inhibe la escisión de una ribozima de auto-escisión, en el que dicha célula huésped comprende:
- (a) un promotor;
- 20
- (b) un ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico; y
- (c) un ácido nucleico que codifica dicha ribozima de auto-escisión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) están unidos de forma operativa al promotor, y la transcripción del ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) produce una molécula de ARN que comprende dicha ribozima de auto-escisión y un ARNm que codifica dicho producto de ácido nucleico, en el que dicha ribozima de auto-escisión es capaz de escindir dicha molécula de ARN intramolecularmente,
- 25
- en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en: inhibidores aminoglicósido, toyocamicina, 8-azaadenosina, sangivamicina, tubercidina, tubercidina-monofosfato cíclico, tubercidina-monofosfato, tubercidina-trifosfato, nebularina, nucleósido tricíclico, 5-fluorouridina, 5-bromouridina, 5-fluorouracilo, Syto-83, bromuro de homidio, naranja de acridina, y un oligonucleótido antisentido de dicha ribozima de auto-escisión.
- 30
12. Una construcción de ADN para uso en terapia, en el que la construcción de ADN comprende:
- (a) un promotor;
- (b) un ácido nucleico que codifica un producto de ácido nucleico; y
- (c) un ácido nucleico que codifica una ribozima de auto-escisión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) están unidos de forma operativa al promotor, y la transcripción del ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) produce una molécula de ARN que comprende dicha ribozima de auto-escisión y un ARNm que codifica dicho producto de ácido nucleico, en el que dicha ribozima de auto-escisión es capaz de escindir dicha molécula de ARN intramolecularmente; y la construcción de ADN se introduce en células de un individuo o células del individuo y se devuelven al individuo, y se administra al individuo un agente que inhibe la escisión de dicha ribozima de auto-escisión de manera que la expresión del producto de ácido nucleico se incrementa, en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en: inhibidores aminoglicósido, toyocamicina, 8-azaadenosina, sangivamicina, tubercidina, tubercidina-monofosfato cíclico, tubercidina-monofosfato, tubercidina-trifosfato, nebularina, nucleósido tricíclico, 5-fluorouridina, 5-bromouridina, 5-fluorouracilo, Syto-83, bromuro de homidio, y naranja de acridina; y opcionalmente en el que el ácido nucleico de (c) codifica al menos dos de dichas ribozimas de auto-escisión.
- 35
- 40
- 45
13. Un método *in vitro* para inducir la expresión de un producto de ácido nucleico en una célula huésped aislada, que comprende poner en contacto dicha célula huésped con un oligonucleótido antisentido de una ribozima de auto-escisión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la célula huésped comprende:
- a) un promotor;
- (b) un ácido nucleico que codifica el producto de ácido nucleico; y
- 50
- (c) un ácido nucleico que codifica una ribozima de auto-escisión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) están unidos de forma operativa al promotor, y la transcripción del ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) produce una molécula de ARN que comprende dicha ribozima de

auto-escisión y un ARNm que codifica dicho producto de ácido nucleico, en el que dicha ribozima de auto-escisión es capaz de escindir dicha molécula de ARN intramolecularmente; y opcionalmente en el que

(i) el oligonucleótido antisentido se empareja por bases con una región de la ribozima de auto-escisión como se muestra en SEQ ID NO: 67; o

5 (ii) el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido modificado seleccionado del grupo que consiste en: morfolino, ARN fosforotioato, ARN 2'-O-metilo, y ARN fosforotioato 2'-O- metoxietilo.

14. Un oligonucleótido antisentido modificado de una ribozima de auto-escisión de las reivindicaciones 1-4; y opcionalmente en el que:

10 (a) el oligonucleótido antisentido modificado se selecciona del grupo que consiste en: morfolino, ARN fosforotioato, ARN 2'-O-metilo, y ARN fosforotioato 2'-O- metoxietilo; o

(b) el oligonucleótido antisentido modificado se empareja por bases con una región de la ribozima de auto-escisión como se muestra en SEQ ID NO: 67.

15. Un método *in vitro* para cribar un agente que inhibe la escisión de una ribozima de auto-escisión, que comprende:

15 (a) introducir en células huésped aisladas una construcción de ADN que comprende:

(1) un promotor;

(2) un ácido nucleico que codifica un informador; y

20 (3) un ácido nucleico que codifica una ribozima de auto-escisión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el ácido nucleico de (2) y el ácido nucleico de (3) están en 3' del promotor y unido de forma operativa a dicho promotor;

(b) poner en contacto dichas células huésped con un agente que se va a evaluar para su capacidad de inhibir la actividad catalítica de dicha ribozima de auto-escisión bajo condiciones apropiadas para la expresión de dicho informador; y

25 (c) ensayar la actividad del informador, en el que la detección de la actividad del informador en presencia de dicho agente que es mayor que la actividad del informador en ausencia de dicho agente identifica al agente como uno que inhibe la escisión de la ribozima de auto-escisión.

16. Un método para producir un animal no humano transgénico que comprende introducir una construcción de ADN en una célula germinal de un animal no humano o una célula germinal de un ancestro de dicho animal, en el que dicha construcción de ADN comprende:

30 (a) un promotor;

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

35 (c) un ácido nucleico que codifica una ribozima de auto-escisión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) están unidos de forma operativa a dicho promotor, y la transcripción del ácido nucleico de (b) y el ácido nucleico de (c) produce una molécula de ARN que comprende dicha ribozima de auto-escisión y un ARNm que codifica dicho producto de ácido nucleico, en el que dicha ribozima de auto-escisión es capaz de escindir dicha molécula de ARN intramolecularmente; y opcionalmente en el que el ácido nucleico de (c) comprende además un ácido nucleico que codifica un aptámero que está en una posición de manera que la actividad de escisión de dicha ribozima de auto-escisión es regulable por la unión de un efector a dicho aptámero.

40 17. Un método *in vitro* para determinar el nivel de un inhibidor de una ribozima de auto-escisión en una célula, que comprende:

(a) introducir en una célula una construcción de ADN que comprende:

(1) un promotor;

(2) un ácido nucleico que codifica un informador; y

45 (3) un ácido nucleico que codifica una ribozima de auto-escisión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el ácido nucleico de (2) y el ácido nucleico de (3) están en 3' del promotor, y unido de forma operativa a dicho promotor, bajo condiciones que resultan en la inhibición de la ribozima de auto-escisión y expresión del informador; y

- (b) ensayar la actividad del informador en la célula producida por (a), en el que el nivel de dicho inhibidor en la célula se identifica comparando la actividad del informador con un control apropiado; y opcionalmente en el que:
- (i) el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en 5-fluorouracilo y 5-fluorouridina; o
- (ii) la célula es una célula de cáncer.
- 5 18. Un método para determinar el nivel de un inhibidor de una ribozima de auto-escisión en una muestra biológica, que comprende:
- (a) poner en contacto una célula con la muestra biológica, en el que la célula expresa una construcción de ADN que comprende:
- (1) un promotor;
- 10 (2) un ácido nucleico que codifica un informador; y
- (3) un ácido nucleico que codifica una ribozima de auto-escisión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el ácido nucleico de (2) y el ácido nucleico de (3) están en 3' del promotor y unido de forma operativa a dicho promotor, bajo condiciones que resultan en la inhibición de la ribozima de auto-escisión y expresión del informador; y
- (b) ensayar la actividad del informador en presencia de la muestra biológica, en el que el nivel de dicho inhibidor en la muestra biológica se identifica comparando la actividad del informador con un control apropiado.
- 15 19. Un método *in vitro* para inhibir la actividad de un ARN catalítico en una célula, que comprende poner en contacto una célula con un oligonucleótido antisentido de una ribozima de auto-escisión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4; y opcionalmente en el que:
- (a) la célula se infecta con un virus o un microorganismo patógeno;
- 20 (b) el oligonucleótido antisentido se empareja por bases con una región de la ribozima de auto-escisión como se muestra en SEQ ID NO: 67; o
- (c) el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido modificado seleccionado del grupo que consiste en: morfolino, ARN fosforotioato, ARN 2'-O-metilo, y ARN fosforotioato 2'-O- metoxietilo.
- 25 20. Un oligonucleótido antisentido de una ribozima de auto-escisión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso en la inhibición de la infección por un virus o un microorganismo patógeno en una célula en un mamífero o planta; y opcionalmente en el que:
- (a) cuando la célula está en un mamífero, la infección está causada por un virus seleccionado del grupo que consiste en un virus de inmunodeficiencia humana, un virus de herpes, un virus de hepatitis, y un papilomavirus humano; o
- (b) la infección está causada por un microorganismo patógeno seleccionado del grupo que consiste en *Notophthalmus virdescens*, *Ambystoma talpoideum*, *Amphiuma tridactylum*, y *Schistosoma mansoni*.
- 30 21. Un kit para regular la expresión génica, que comprende un ácido nucleico que comprende:
- (a) una ribozima de auto-escisión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4; y
- (b) un sitio de clonación para la introducción de una secuencia de nucleótidos diana para ser transcrita unida de forma operativa a la ribozima de auto-escisión.
- 35 22. El kit de la reivindicación 21,
- (a) que comprende además un agente que inhibe la escisión de la ribozima de auto-escisión, en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en: inhibidores aminoglicósido, toyocamicina, 8-azaadenosina, sangivamicina, tubercidina, tubercidina-monofosfato cíclico, tubercidina-monofosfato, tubercidina-trifosfato, nebularina, nucleósido tricíclico, 5-fluorouridina, 5-bromouridina, 5-fluorouracilo, Syto-83, bromuro de homidio, naranja de acridina, y un
- 40 oligonucleótido antisentido de dicha ribozima de auto-escisión, en el que la transcripción de la secuencia de nucleótidos diana se inhibe en ausencia del agente; o
- (b) en el que el ácido nucleico comprende al menos dos de dichas ribozimas de auto-escisión.

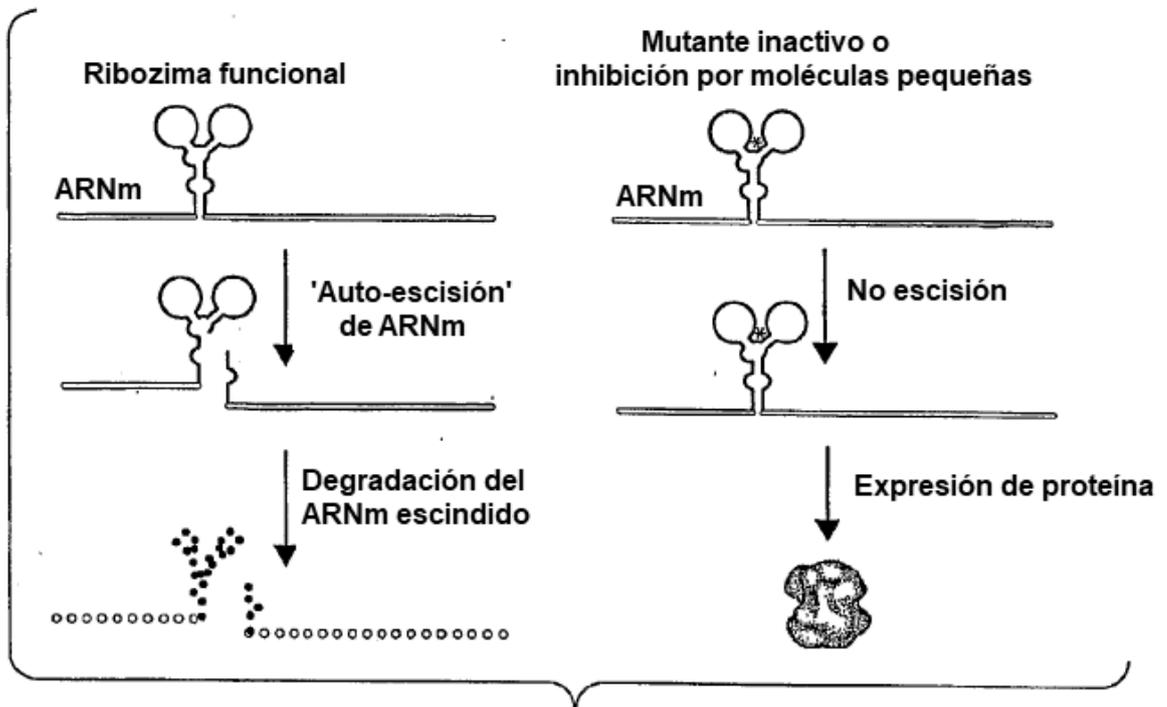


Fig. 1A

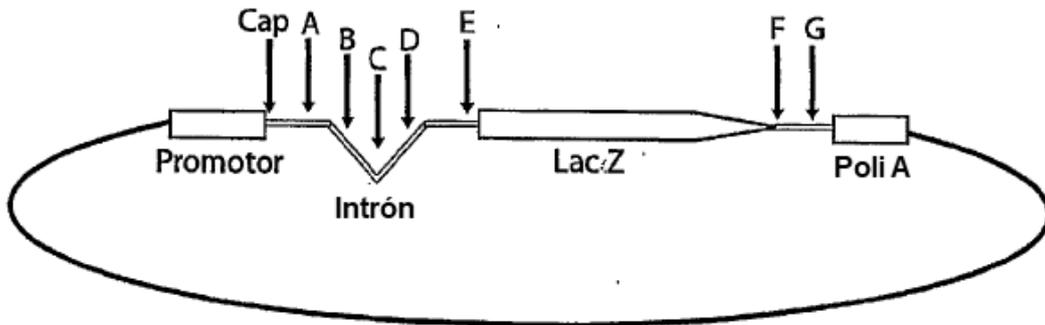


Fig. 1B

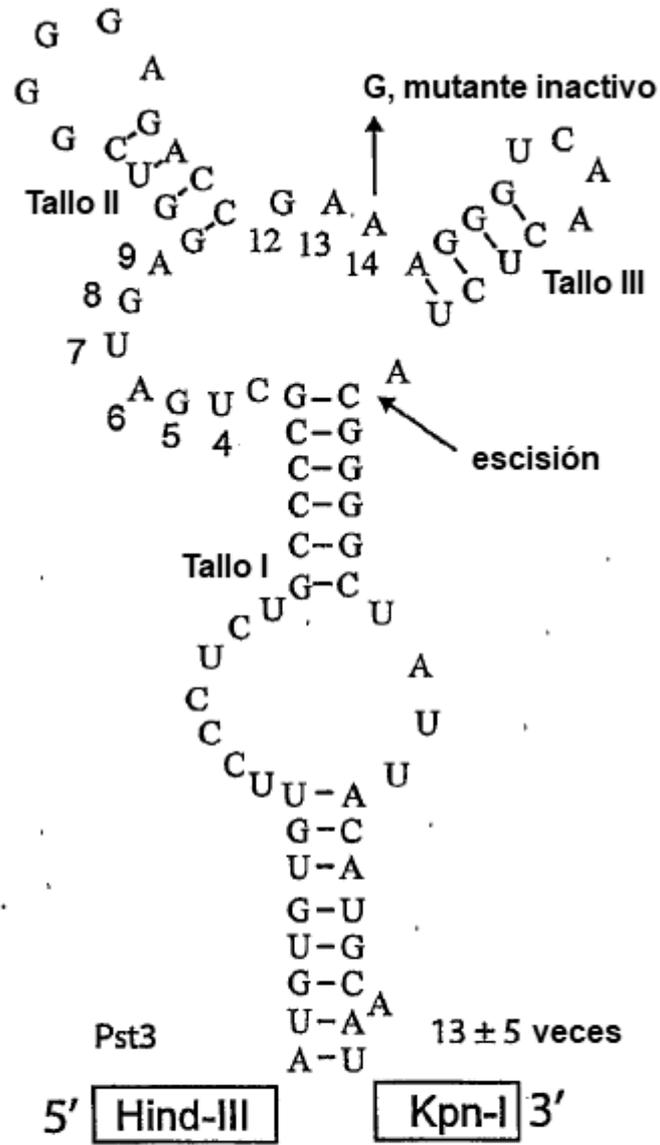


Fig. 1C

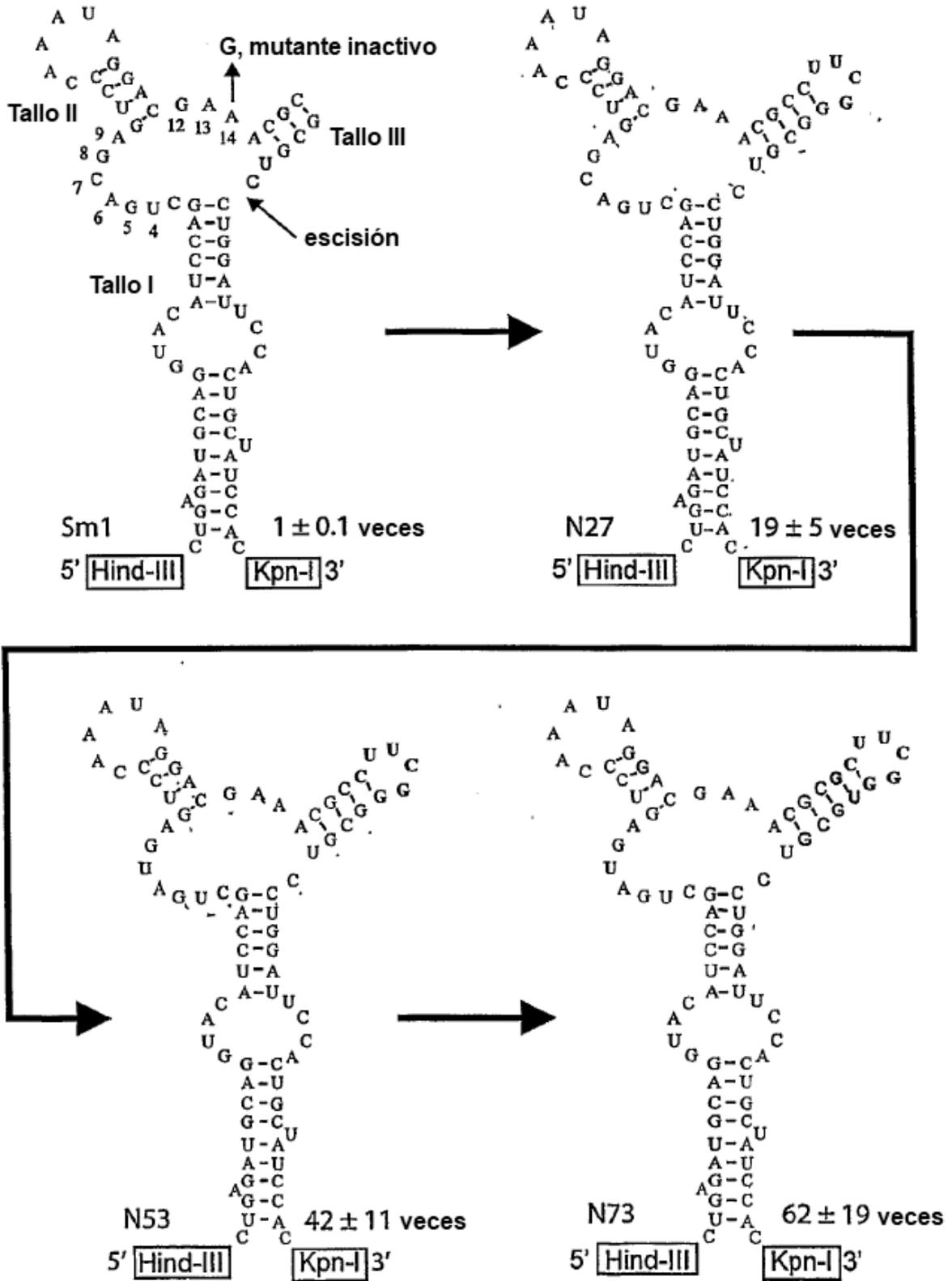


Fig. 1D

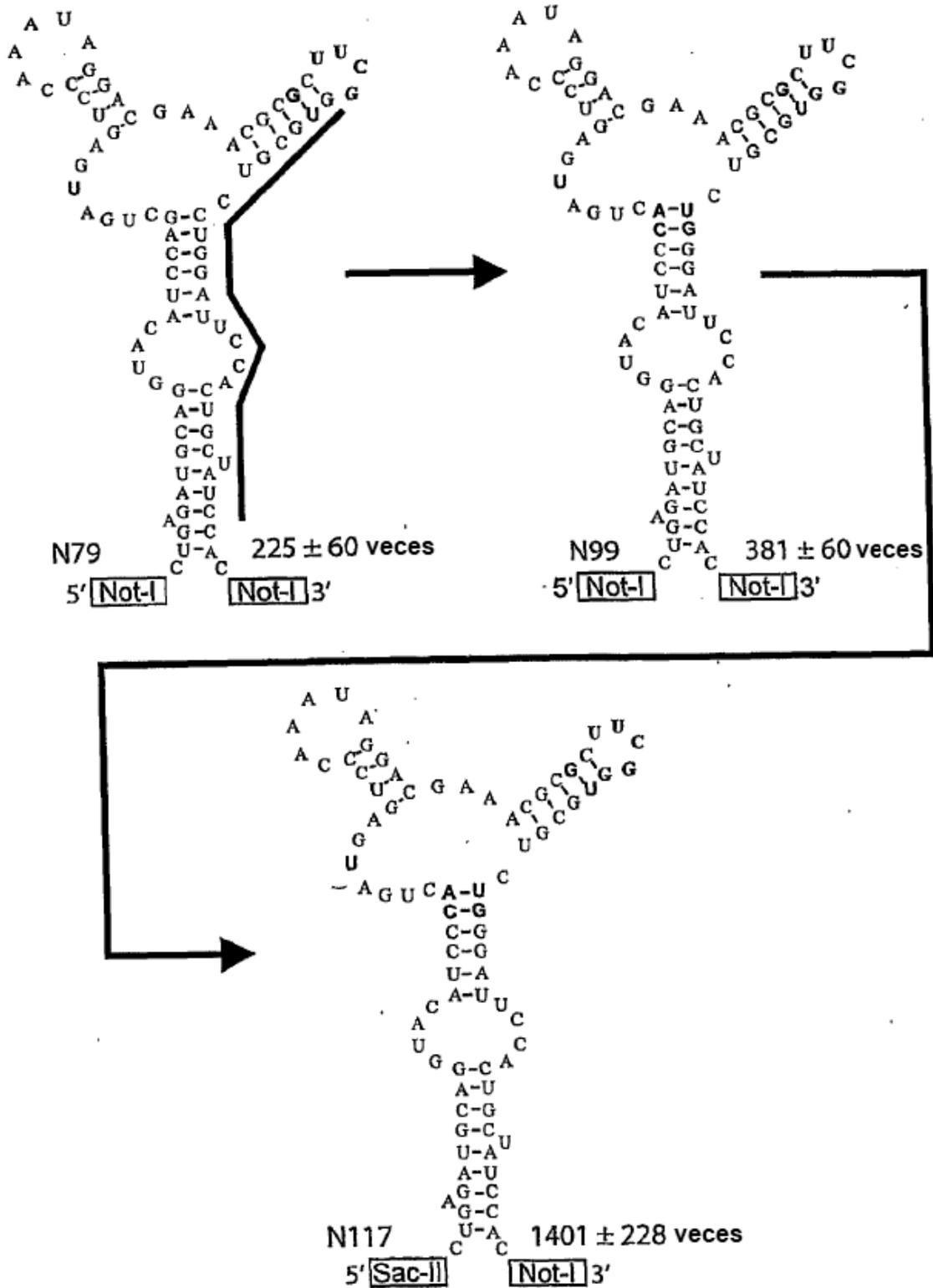


Fig. 1E

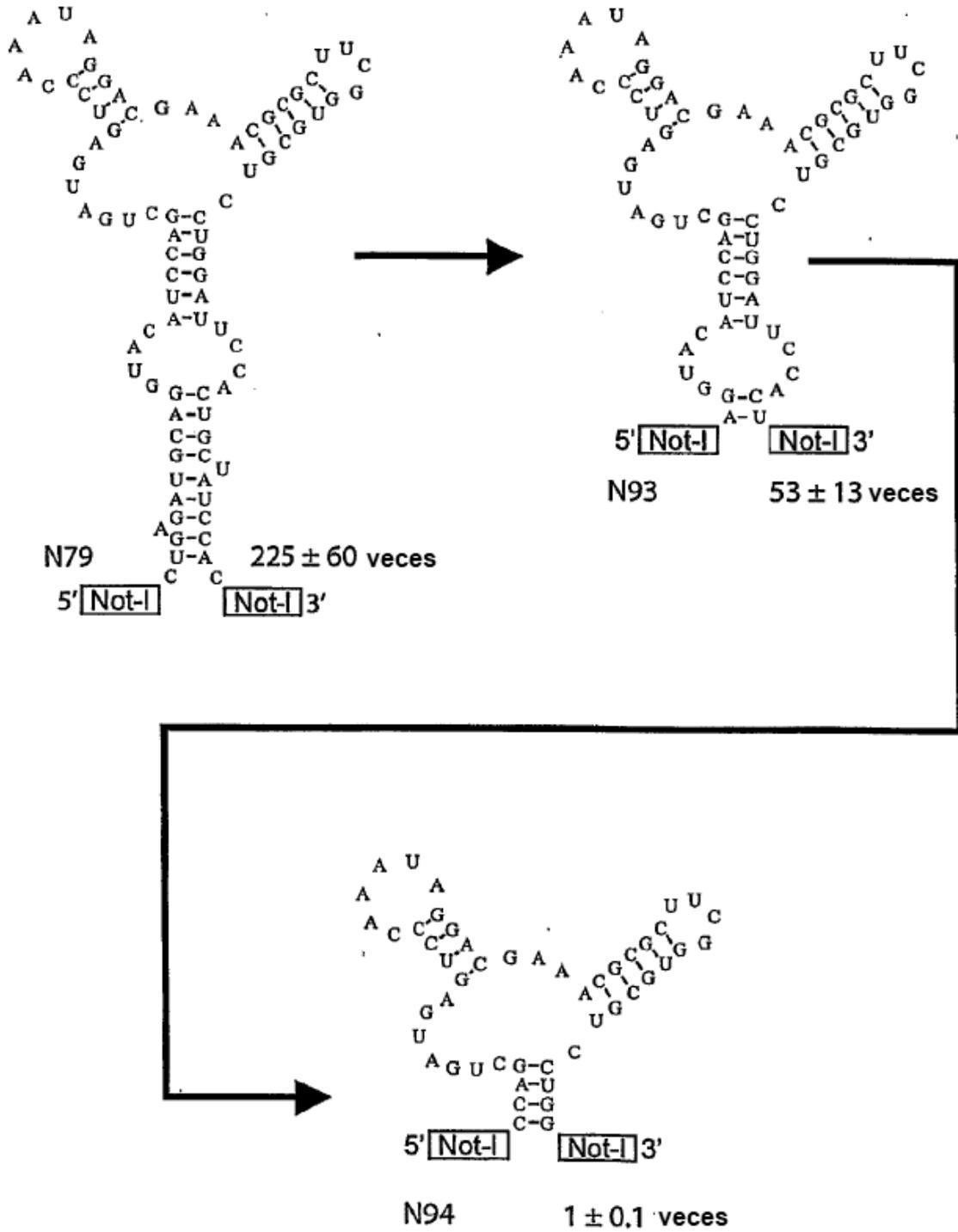
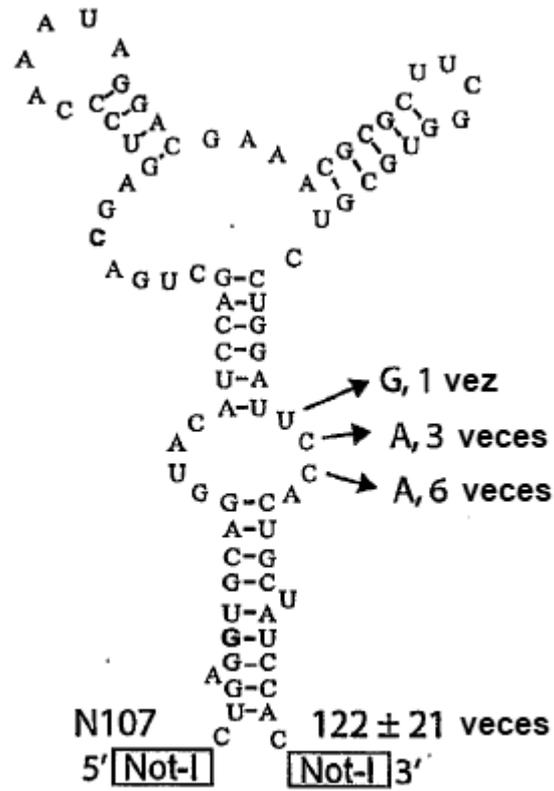


Fig. 1F



	Riñón	Cáncer de cuello uterino	Melanoma	Ovario	Fibroblasto
Tipo de células	293T	Hela	B16	CHO	3T3
Rz Funcional	0,27	0,00	0,03	0,00	0,00
Rz Inactiva	109,6	8,8	22,8	10,0	7,6
Veces de Disminución	403	N/A*	671	N/A*	N/A*

\* La actividad del gen informador de la construcción de ribozima funcional fue indetectable.

Fig. 2A

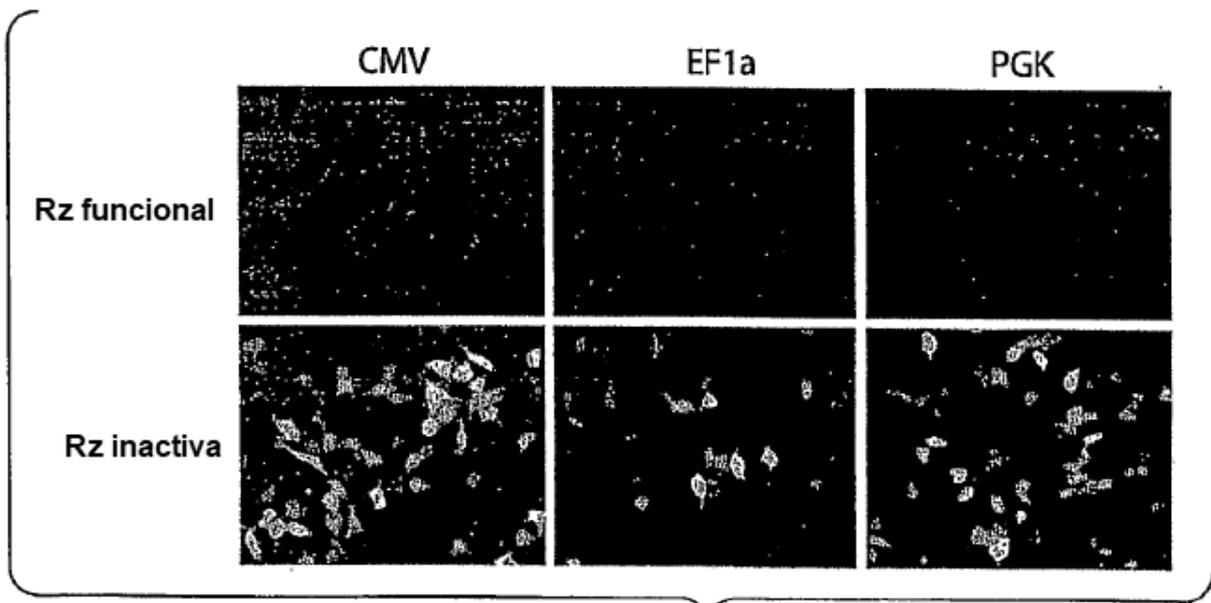


Fig. 2B

Posición	5'UTR			Intrón			3'UTR	
	Cap	A	E	B	C	D	F	G
N79 único	102 ± 17	62 ± 19	225 ± 60	2 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	4 ± 2	3 ± 1
N79 doble	205 ± 56	44 ± 7	3.183 ± 717				6 ± 1	

Fig. 2C

Inducción	en veces	por porcentaje
N79 único	31	27%
	23	35%
	69	34%
N79 doble	2.012	38%
	851	50%
	110	5%
	200	5%

Fig. 3A

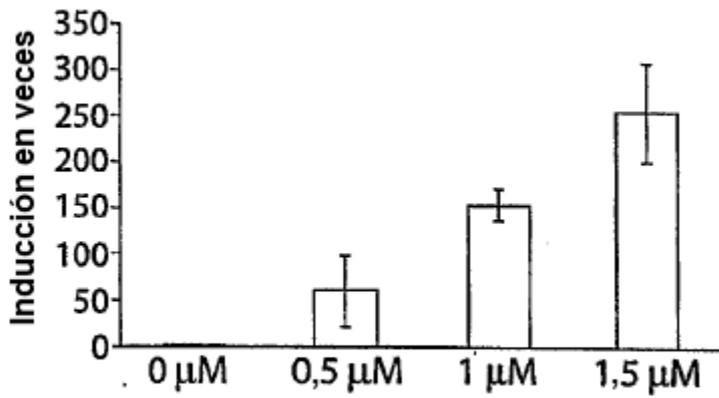


Fig. 3B

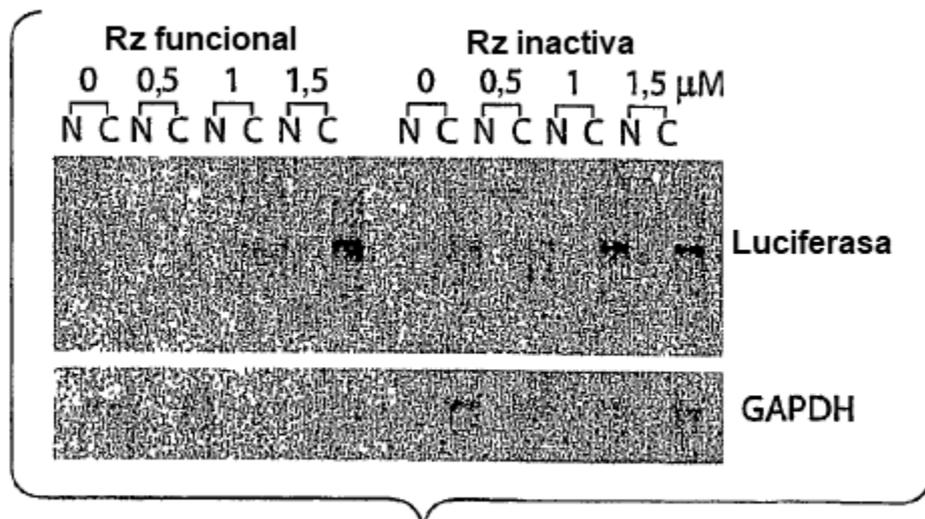


Fig. 3C

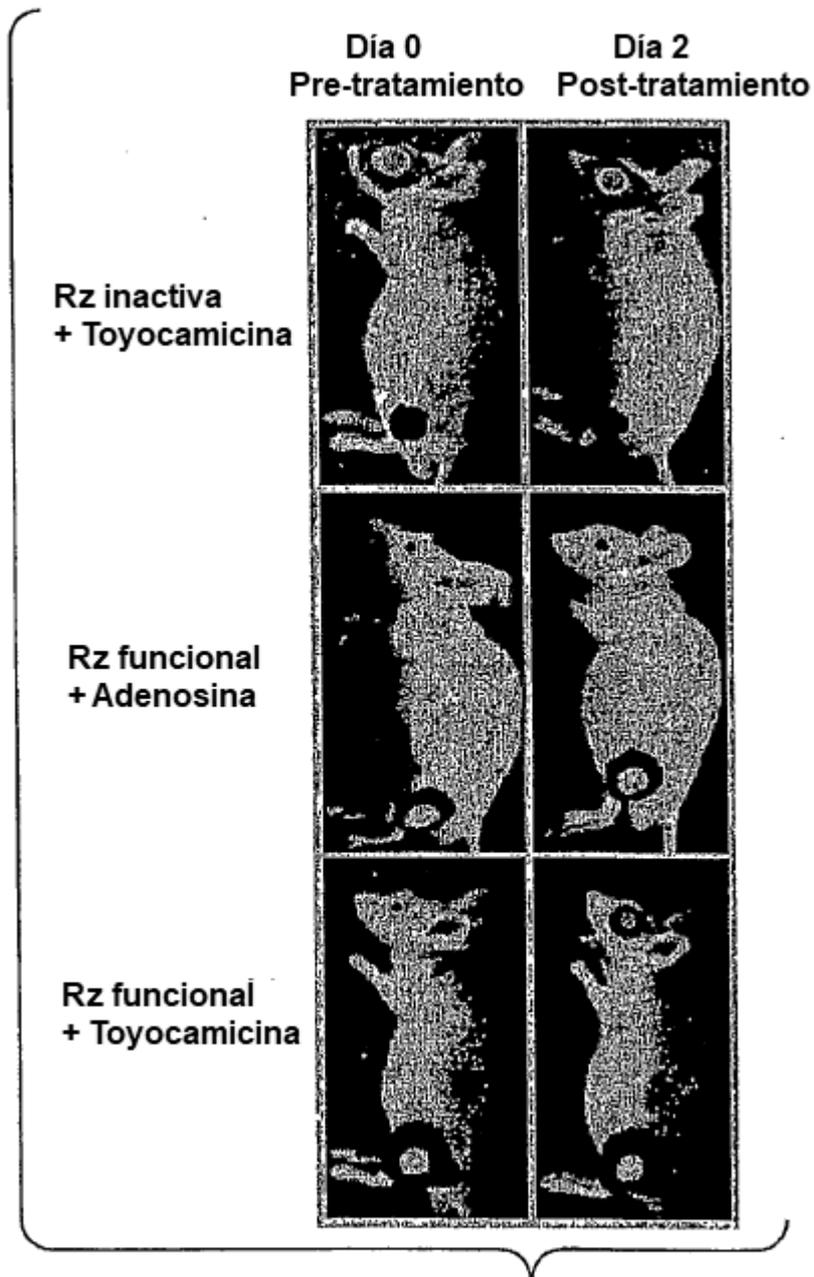


Fig. 4

Modificaciones principales que mejoran la función de ribozima de Schisto

Secuencia de N79 de Schisto: CUGAGAUGCAGGUA CAUCCAGCUGAUGAGUCCCAAUAAGGACGAAACGGcguucggucCGUCCUGGAUUCCACUGCUAUCCAC

Diferencia en veces (Mutante frente a tipo salvaje)	Nombre de la Ribozima	tallo-I distal	bucle-I	tallo-I proximal	núcleo	tallo-II	bucle-II	tallo-II	núcleo	tallo-III	bucle-III	tallo-III núcleo proximal	bucle-I	tallo-I distal
		5' 12 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83												
0	N5 (Schisto Natural)	CUGAGAUGCAGGUA CAUCCAGCUGAUGAGUCCCAAUAAGGACGAAACGG												GGGUCUGGAUUCCACUGCUAUCCAC
19	N27									c uucg g				
52	N53			u						c uucg g				
71	N73			u						gcuucggu				
266	N79			u						gcuucggu				
410	N99		ca	u						gcuucggu		ug		
1400	N117		ca	u						gcuucggu		ug		

Fig. 5A

Las modificaciones en el sitio de escisión GUC disminuyen generalmente la función de ribozima Schisto

	5'	12	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	3'
	CUGAGAGUCAGGUA CAUCCAGCUGAUGAGUCCCAAUAGGACGAAACGCC UUCG GGCUGCUGGAUCCACUGGCUAUCCAC																																																																																																				
	g																																																																																																				
	u																																																																																																				
	a																																																																																																				
	c c																																																																																																				
	c g																																																																																																				
	c u																																																																																																				
	c a																																																																																																				
52	N53																																																																																																				
3	N65-2																																																																																																				
12	N65-3																																																																																																				
34	N65-4																																																																																																				
2	N66-1																																																																																																				
3	N66-2																																																																																																				
4	N66-3																																																																																																				
1	N66-4																																																																																																				

Fig. 5B



Algunas modificaciones en el bucle-III disminuyen la función de ribozima de Schisto

		tallo-I distal	bucle-I	tallo-I proximal	núcleo	tallo-II	bucle-II	tallo-II núcleo	tallo-III	bucle-III	tallo-III núcleo	tallo-III proximal	bucle-I	tallo-I distal
	5'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Diferencia en veces														
(Mutante frente a tipo salvaje														
Nombre de la Ribozima														
52	N53	CUGAGAU	G	CAGGUA	CAUCCAG	CUGAUG	AGUCCCA	ADAGG	CGAAAC	GCC	UUCG	GGC	GUC	UGGAUCCACUGGCUA
26	N64													C
13	N64-2													U
10	N64-4													a
4	N64-5													g

Fig. 5D

Las modificaciones en el bucle-I disminuyen la función ribozima de Schisto

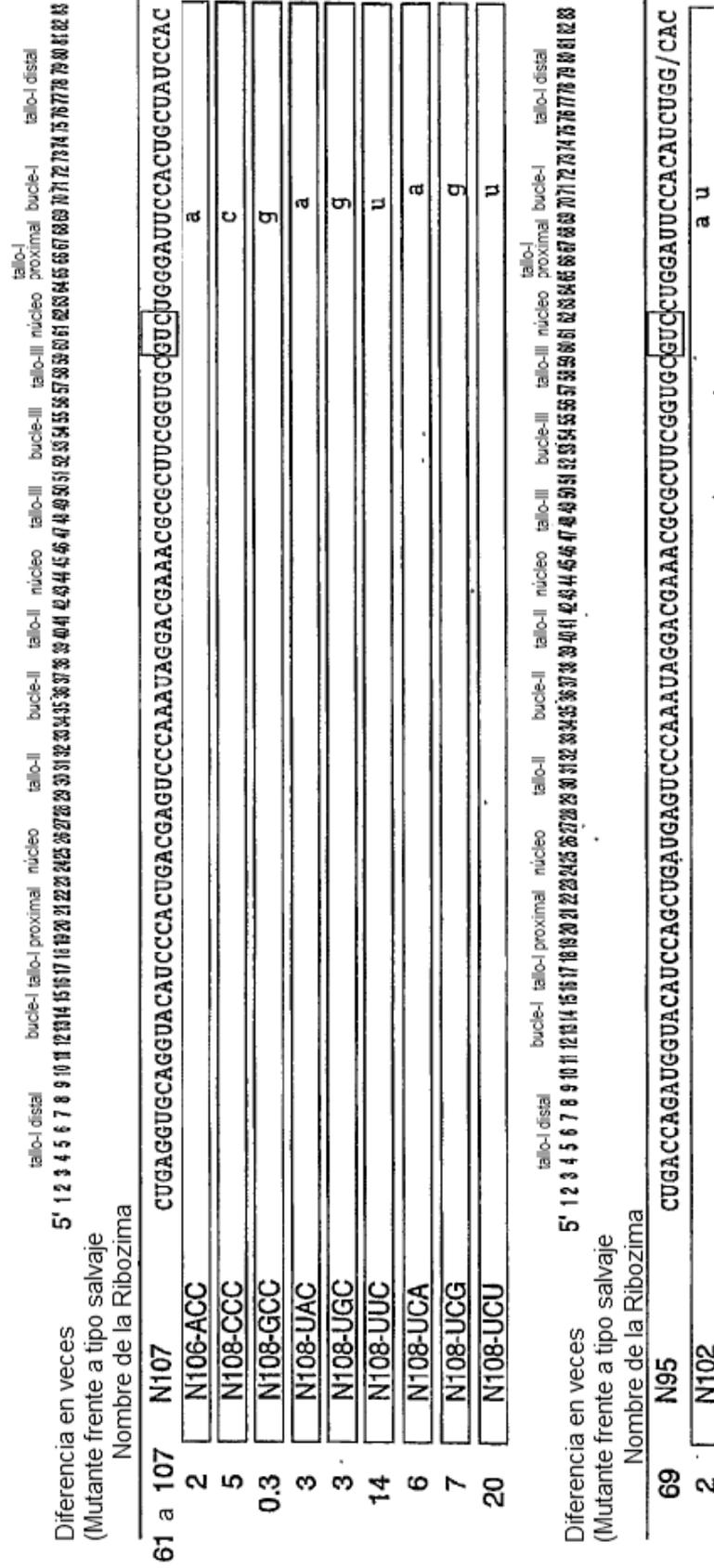


Fig. 5E

Las modificaciones en el bucle-I disminuyen la función de ribozima de Schisto excepto para N99

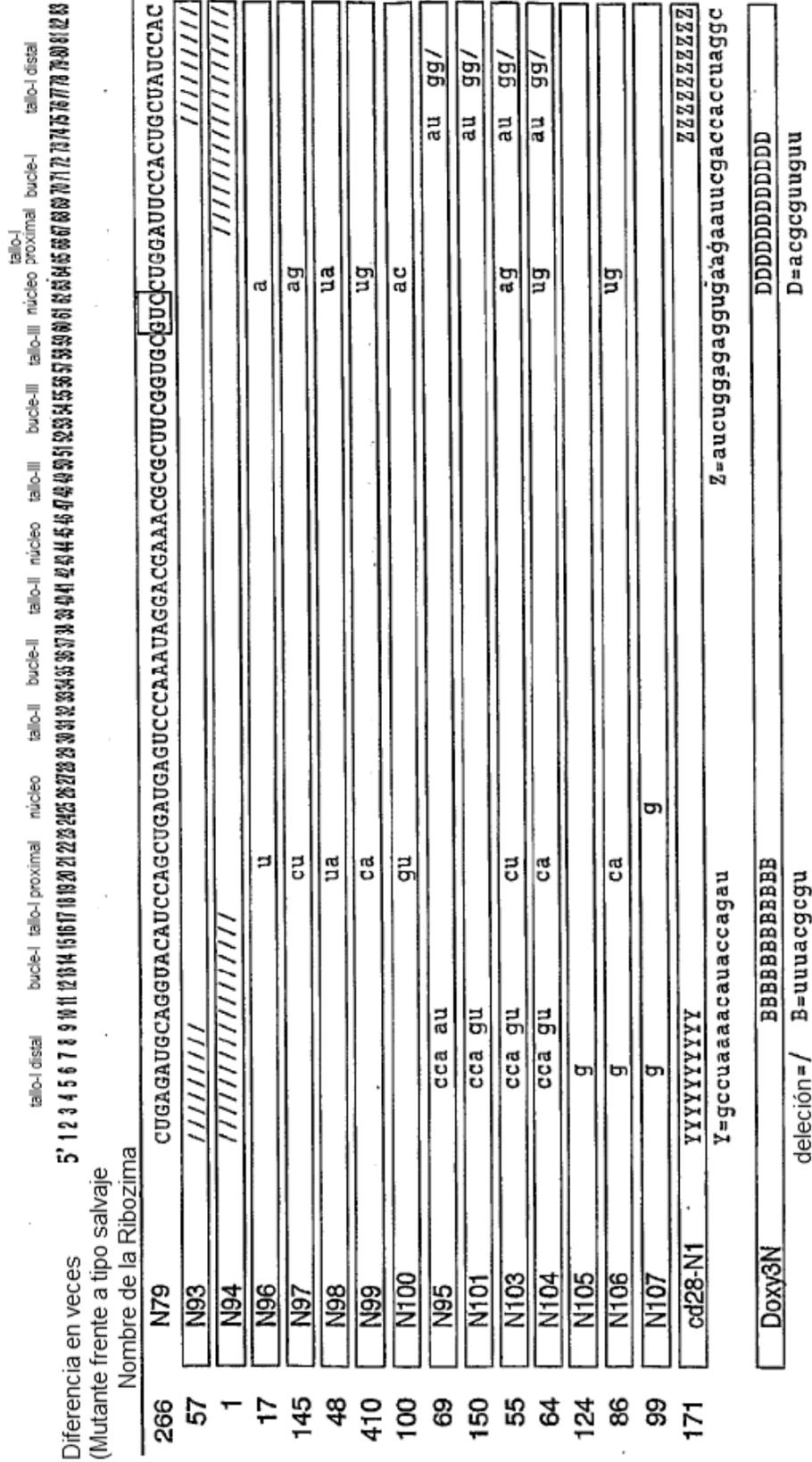


Fig. 5F

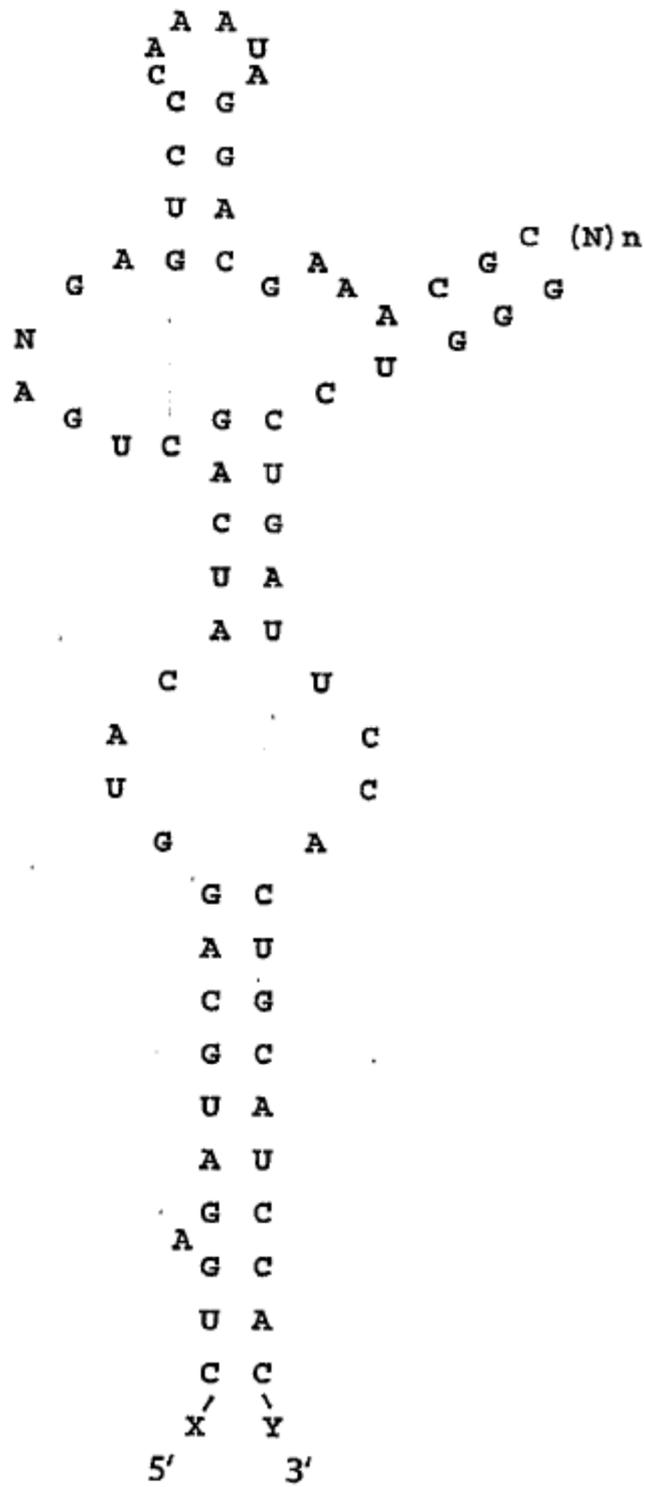


Fig. 6

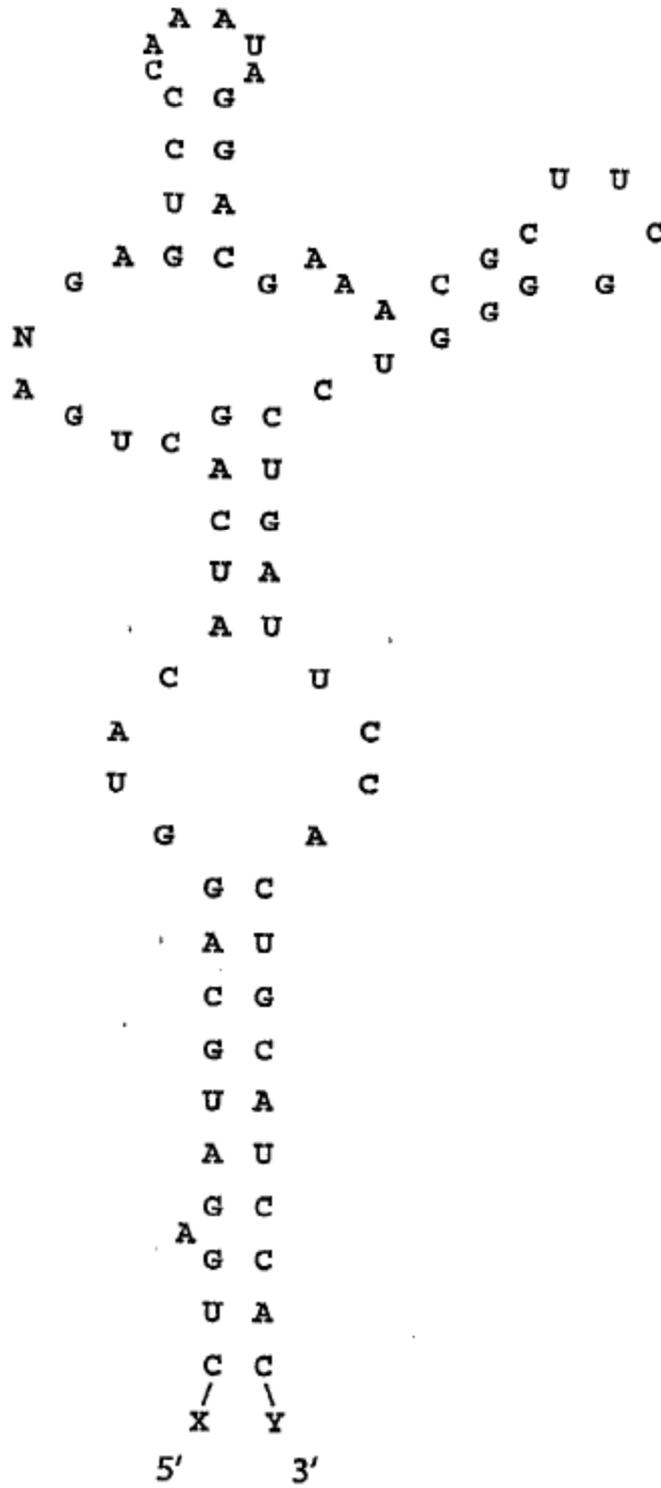


Fig. 7

Secuencia de HDM-nLacZ

AGCTTGGCCCATTCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATT  
 ACCGCCATGT TGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGG  
 AGTTCGCGT TACATAACTTACGGTAAATGGCCCCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATG  
 ACGTATGTTCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTT  
 GGCAGTACAT CAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATG  
 CCCAGTACAT GACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG  
 TTTTGGCAGT ACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGAAGTACCGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGG  
 GAGTTTGTGTT TGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAATGGGCGGTA  
 GCGGTGTACG GTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGT  
 TTTGACCTCC ATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCCTCGAAGCTGATCCTGAGAAGTTCAGGGTGAGTCTATGG  
 GACCCTTGAT GTTTTCTTTCCCTTCTTTCTATGGTTAAGTTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAAGTACAGGGTACACAT  
 ATTGACCAAA TCAGGTAATTTTGCATTGTAAATTTAAAAAATGCTTCTTCTTTAATATACITTTTGTATTATCTTA  
 TTTCTAATAC TTTCCCTAATCTCTTTCTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTCTAAAGA  
 ATAACAGTGA TAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATGTAACTGATG  
 TAAGAGGTTT CATATGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGAT  
 TATTCTGAGT CCAAGCTAGGCCCTTTTGTAAATCATGTTTACACCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACGTGC  
 TGGTCTGTGT GCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTCCGCGGGCGGCCCATGGCGCCAAAAAGAAGAGAAAGGTAA  
 AGATCCCCGG GAATFCACTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTT  
 GCAGCACATC CCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCT  
 GAATGGCGAA TGGCGCTTTCCTGGTTTCCGGCACAGAAGCGGTGCCGAAAGCTGGCTGGAGTGGATCTTCTGAGG  
 CCGATACTGT CGTCTGCCCTCAAACCTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCCATT  
 ACGGTCAATC CGCCGTTTGTTCACCGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCT  
 ACAGGAAGGC CAGACCGAATTTATTTTGTATGGCGTTAACTCGGCGTTTTCATCTGTGGTGCACGGGCGCTGGGTGGT  
 ACGGCCAGGA CAGTCGTTTGCCTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTACCGCCGGAGAAAACCGCCTCGCGGTGATG  
 GTGCTGCGCT GGAGTGACGGCAGTTATCTGGAAGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCGTT  
 GCTGCATAAA CCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTTGCCACTCGCTTAAATGATGATTTTCCGCGCTGTACTGG  
 AGGCTGAAGT TCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTACTACCTACGGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGGTGAAAACGAGGTC  
 GCCAGCGGCA CCGCGCTTTCGGCGGTGAAATTTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCACACTACGTCTGAA  
 CGTCGAAAAC CCGAAACTGTGGAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGGGTTGGTTGAACTGCACACCGCCGACGGCA  
 CGCTGATTGA AGCAGAAGCCTGCGATGTGGTPTCCGCGAGGTGCGGATGAAAATGGTCTGCTGCTGTAACGGCAAG  
 CCGTTGCTGA TTCGAGGCGTTAACCGTCACGAGCATCATCCTCTGCATGGTCAGGTATGGATGAGCAGACGATGGTGCA  
 GGATATCCTG CTGATGAAGCAGAACAACTTTAAACGCGGTGCGCTGTTTCGCATTATCCGAACCATCCGCTGTGGTACACGC  
 TGTGCGACCG CTACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAATATTGAAACCCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACC  
 GATGATCCGC GCTGGCTACCGCGATGAGCGAACGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGCGATCGTAATCACCCGAGTGTGAT  
 CATCTGGTCG CTGGGAATGAATCAGGCCACGGCGTAATCACGACGCGTGTATCGCTGGATCAAATCTGTGATCCTT  
 CCCGCCCGGT GCAGTATGAAGGCGGCGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGCCGATGTACGCGCGCGTGGAT  
 GAAGACCAGC CCTTCCCGCTGTGCCGAAATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTTCGCTACCTGGAGAGACGCGCCCGCTGAT  
 CCTTTGCGAA TACGCCACGCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTGGCAGGCGTTTCGTCAGTATCCCC  
 GTTTACAGGG CGGCTTCGCTCTGGGACTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAATATGATGAAAACGGCAACCCGTGGTGGCT  
 TACGGCGGTG ATTTTGGCGATACGCCAAGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCCGACCGCACGCCGCA  
 TCCAGCGCTG ACGGAAGCAAAACACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCCGTTTATCCGGSCAAACCATCGAAGTGACCAGCG  
 AATACCTGTT CCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGGATGGTAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAA  
 GTGCCCTCTGG ATGTCGCTCCACAAGGTAACAGTTGATTGAACTGCCGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCCGGGCAACT  
 CTGGCTCACA GTACGCTAGTGCAACCGAACGCGACCGCATGGTCAGAAGCCGGGCACATCAGCGCCTGGCAGCAGTGGC  
 GTCTGGCGGA AAACCTCAGTGTGACGCTCCCCCGCGTCCCAAGCCATCCCGCATCTGACCACCAGCGAAATGGATTTT  
 TGCATCGAGC TGGGTAATAAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTACAGATGTGGATGGCGATAAAAA  
 ACAACTGCTG ACGCCGCTGCGGATCAGTTCACCCGTGCACCGCTGGATAACGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCA

Fig. 8A

TTGACCTAA CGCCTGGGTCGAAACGCTGGAAGGCGGCGGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAGTGCACGGCA  
 GATACACTTG CTGATGCGGTGCTGATTACGACCGCTCACGCGTGGCAGCATCAGGGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGAA  
 AACCTACCGG ATTGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGTGGCGAGCGATACACCGCATCCGGCGC  
 GGATTGGCCT GAACTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAAACTGGCTCGGATTAGGGCCGCAAGAAAACCTATCCC  
 GACCGCCTTA CTGCCGCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTGACACATGTATACCCCGTACGTCTTCCCGAGCGA  
 AAACGGTCTG CGCTGCGGGACGCGCAATTGAATTATGGCCACACCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCACATCAGCC  
 GCTACAGTCA ACAGCAACTGATGGAACAGCCATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGAC  
 GGTTTCCATA TGGGGATTGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATTCAGCTGAGCGCGGTCGCTA  
 CCATTACCAG TTGGTCTGGTGTCAAAAATAATAAACCAGGGCAGGGGGGATCCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGA  
 GGGCCAGAT CTAATTCACCCACAGTGCAGGCTGCCTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGGCTAATGCCCTGGCCAC  
 AAGTATCACT AAGCTCGCTTCTGCTGTCCAATTTCTATTAAGGTTCTTTGTTCCCTAAGTCCAACTACTAAACtgg  
 gggatattat gaagggccttccggagcatctggattctgcctaataaaaaacatttattttcattgcaatgatgtatttA  
 AATTATTTCT GAATATTTTACTAAAAGGAATGTGGGAGTTCAGTGCATTTAAAACATAAAGAAATGAAGAGCTAGTTC  
 AAACCTTGGG AAAATACACTATATCTTAACTCCATGAAAGAAGGTGAGGCTGCAAACAGCTAATGCACATTGGCAACAG  
 CCCCTGATGC CTATGCCCTTATTCATCCCTCAGAAAAGGATTCAGTAGAGGCTTGATTTGGAGGTTAAAGTTTGGCTATG  
 CTGTATTTTA CATTACTTATGTTTTAGCTGTCTCATGAATGTCTTTTCACTACCCATTGCTTATCCTGCATCTCTCA  
 GCCTTGACTC CACTCAGTTCCTTGTCTTAGAGATAACACCTTCCCCTGAAGTGTTCCTTCCATGTTTTACGGCGAGATG  
 GTTCTCCTC GCCTGGCCACTCAGCCTTAGTTGTCTGTGTCTTATAGAGGCTACTTGAAGAAGGAAAAACAGGGGG  
 CATGGTTTGA CTGTCTGTGAGCCCTTCTCCCTGCCTCCCCACTCACAGTGACCCGGAATCCCTCGACATGGCAGTCT  
 AGATCATCTT TGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATAGGTTTCTTAGA  
 CGTCAGGTGG CACTTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG  
 CTCATGAGAC AATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCG  
 CCTTATCCCT TTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAG  
 ATCAGTTGGG TGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAA  
 CGTTTTCCAA TGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACT  
 CGGTCCGCCG ATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGA  
 CAGTAAGAGA ATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGCCAACCTTACTTCTGACAAAGATCGGAGGA  
 CCGAAGGAGC TAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGA  
 AGCCATACCA AACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAAC  
 TACTTACTCT AGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCC  
 CTTCCGGCTG GCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATGTCAGCACTGGGGCC  
 AGATGGTAAG CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCG  
 CTGAGATAGG TGCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAA  
 CTTCATTTTT AATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTAACGTGAGTTTTTC  
 GTTCCACTGA GCGTCAGACCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCT  
 TGCAAACAAA AAAACCAACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC  
 GGCTTCAGCA GAGCGCAGATACCAATACTGTTCTTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC  
 ACCGCCTACA TACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGG  
 ACTCAAGACG ATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGA  
 ACGACCTACA CCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAG  
 GTATCCGGTA AGCGGCAGGGTCCGAAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCAGGGGGAAACGCTGATCTTTATAGTC  
 CTGTCCGGTT TCGCCACCTCTGACTTGGAGCTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCC  
 AGCAACGGAT GCGCCGCGTGCCTGCTGGAGATGGCGGACCGGATGGATATGTTCTGCCAAGGGTTGGTTGCGCATTTC  
 ACAGTTCTCC GCAAGAATTGATTGGCTCCAATTTTGGAGTGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCCGCGGCTTCCATTTCAG  
 GTCGAGGTGG CCCGCTCCATGCACCGCAGCAACGCGGGGAGGAGACAAGGTATAGGGCGGCGCTACAATCCATGC  
 CAACCGTTC CATGTGCTCGCCGAGGCGGCATAAATCCCCGTGACGATCAGCGGTCCAATGATCGAAGTTAGGCTGGTAA  
 GAGCCGCGAG CGATCCTTGAAGCTGTCCCTGATGGTGTCTACCTGCCTGGACAGCATGGCCTGCAACGCGGGCATC  
 CCGATGCCGC CGGAAGCGAGAAGAAATCATAATGGGGAAGGCCATCCAGCCTCGCGTGGGGAGCTTTTTGCAAAAGCCTA  
 GGCCTCCAAA AAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAAA  
 ATTAGTCAGC  
 CATG

Fig. 8B

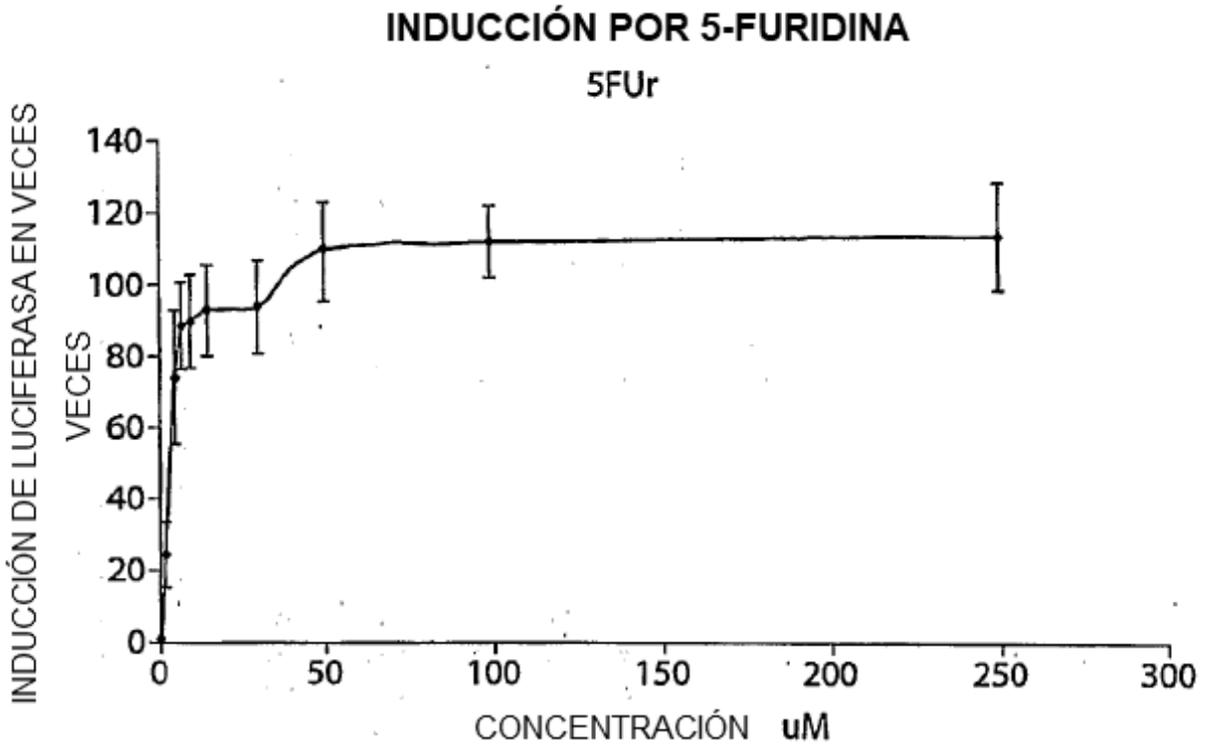


Fig. 9A

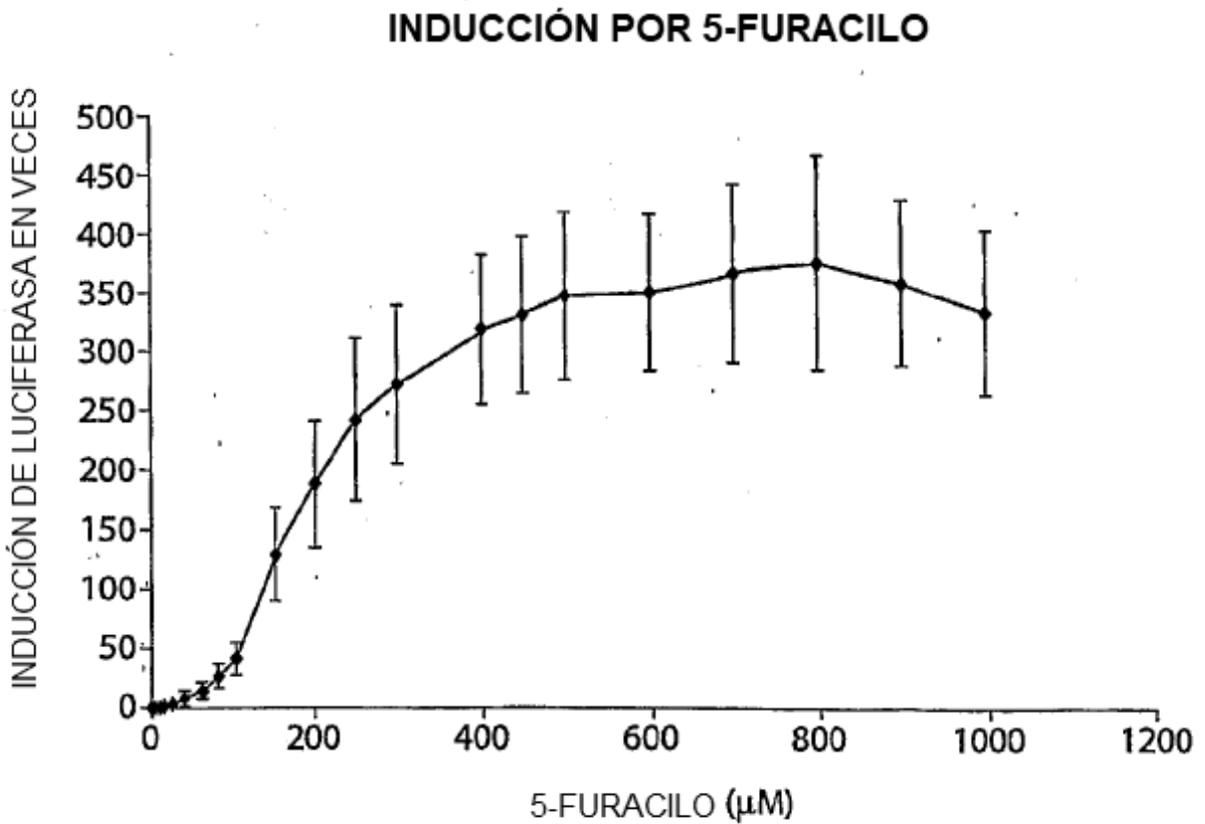


Fig. 9B

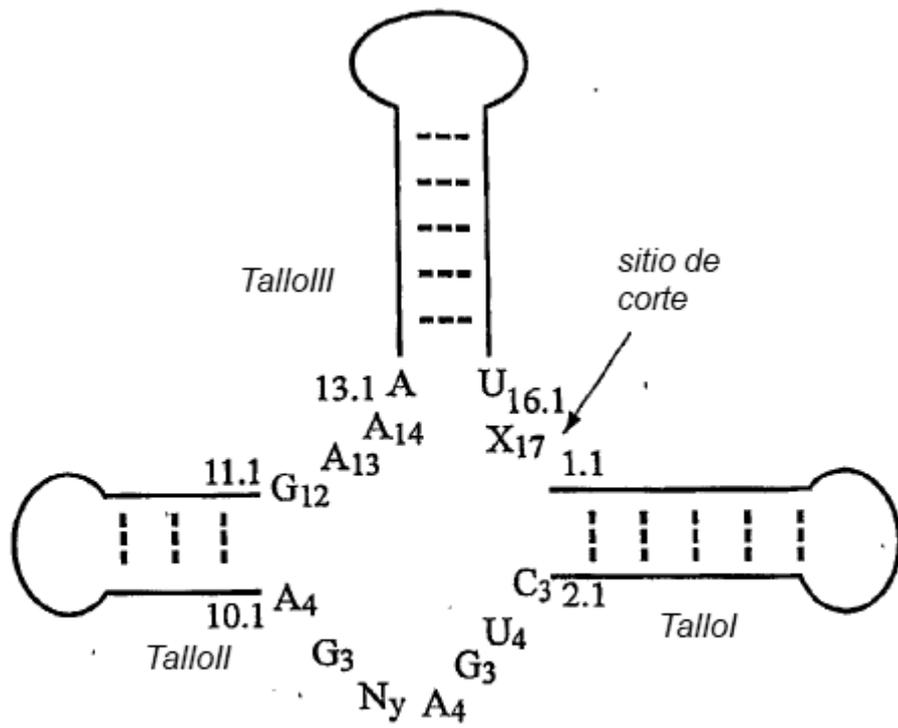


Fig. 10A

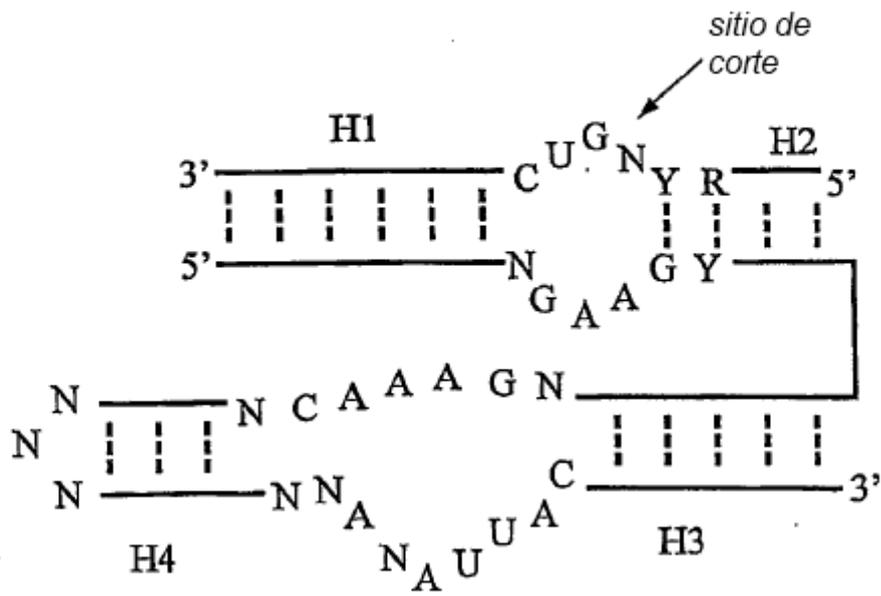


Fig. 10B



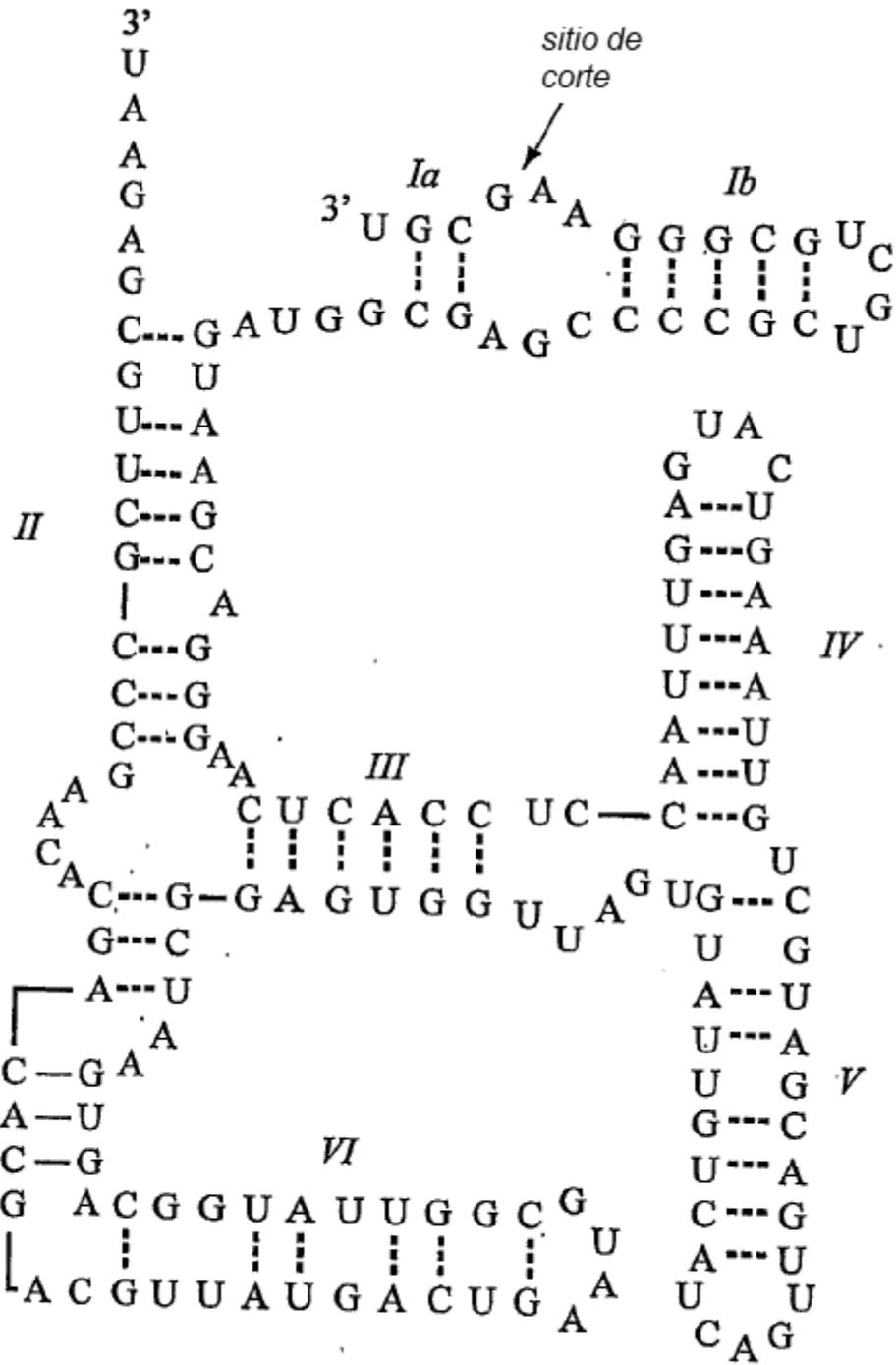


Fig. 10D





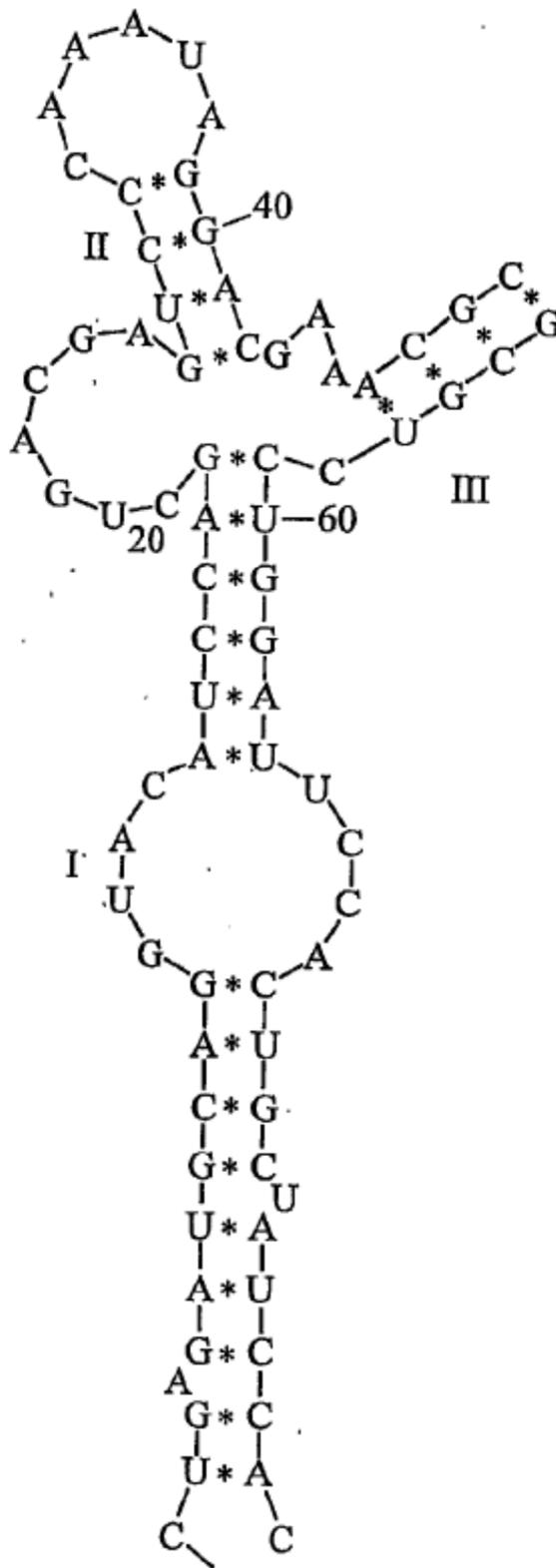


Fig. 13