

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 214**

21 Número de solicitud: 201030569

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/113 (2000.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **19.04.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
13.12.2011

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 45%)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad Politécnica de Valencia (Titular al 45%) y
Universitat de Valencia, Estudi General (Titular al 10%)

72 Inventor/es: **Peña del Rivero, Marcos de la;**
Sánchez Navarro, Jesús y
García Robles, Inmaculada

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Incremento de la expresión de secuencias recombinantes en eucariotas.**

57 Resumen:

Incremento de la expresión de secuencias recombinantes en eucariotas.

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología, en concreto, la presente invención se refiere al uso de un polinucleótido que comprende una secuencia de autocorte ribozimático insertada en la secuencia de un intrón nuclear no autocatalítico, para el incremento de la expresión de la secuencia nucleotídica aislada en la que a su vez se inserta dicho polinucleótido, respecto de un control y en un sistema de expresión eucariótico. La secuencia nucleotídica aislada que aumenta su expresión como consecuencia de la inserción de dicho polinucleótido, puede codificar para una proteína o para una secuencia de ARN maduro no traducible.

DESCRIPCIÓN

Incremento de la expresión de secuencias recombinantes en eucariotas.

5 **Estado de la técnica anterior**

Los ribozimas son dominios de ARN capaces de catalizar autónomamente diferentes reacciones bioquímicas de forma similar a como lo hacen las proteínas. Entre los ribozimas descritos en la literatura se pueden destacar la RNasa P, los intrones del grupo I y II, el “espliceosoma” o incluso el propio ribosoma, así como toda una familia de pequeños
10 ARNs (<100 nt) que catalizan su propio autocorte de forma eficiente en un punto específico de su secuencia, actividad bioquímica que no existe en el mundo proteico en ausencia de componentes de ARN. Estos pequeños ribozimas de autocorte fueron inicialmente descubiertos hace casi 25 años en patógenos de plantas (ribozimas tipo cabeza de martillo o “hammerhead” y tipo horquilla o “hairpin”, en viroides y satélites de virus de plantas) así como en el
15 satélite de un virus humano (ribozima de tipo hepatitis delta o “HDV-like”).

Desde entonces, dichos ribozimas han venido considerándose como simples curiosidades restringidas a este grupo de patógenos. Sin embargo, el ribozima de cabeza de martillo fue descrito posteriormente en el ADN repetitivo de varios organismos eucariotas no relacionados como salamandras (Epstein y Gall, 1987. *Cell*, 48: 535-543), tremátodos (Ferbeyre *et al.*, 1998. *Mol Cell Biol*, 18: 3880-3888) y grillos (Rojas *et al.*, 2000. *NAR* 28: 4037-4043) y, más recientemente, en la planta *A. thaliana* (Przybilski *et al.*, 2005. *Plant Cell*, 17: 1877-85) y en las regiones 3’ no codificantes de genes Clec2 de roedores (Martick *et al.*, 2008. *Nature*, 454: 899-902). Por otro lado, el grupo de Luptak y Szostak describió en 2006 la presencia conservada de un ribozima funcional de tipo hepatitis-delta en un intrón de un gen humano (Salehi-Ashtiani *et al.*, 2006. *Science*, 313: 1788-1792) cuya posible función sigue hasta la fecha sin estar caracterizada. En Noviembre del pasado 2009 (Webb *et al.*, 2009. *Science*, 326: 953), el grupo de Luptak ha descrito una sorprendente ubicuidad del ribozima tipo hepatitis-delta en genomas de una amplia variedad de organismos, que van desde bacterias a invertebrados y vertebrados inferiores. Destaca especialmente la aparición habitual de las mismas en regiones intrónicas de multitud de genes.

El incremento de la expresión de secuencias nucleotídicas de interés, fundamentalmente secuencias que codifican para proteínas, es un problema que se intenta resolver con diferentes técnicas recombinantes, fundamentalmente con el uso de secuencias promotoras de la expresión, como por ejemplo, el promotor 35S sólo o en varias copias en tándem, que permite una expresión ectópica constitutiva de la secuencia de interés en el organismo huésped. En este sentido, es conocido un sistema para incrementar la expresión genética en plantas que incluye una secuencia que codifica para un ribozima, situado en el extremo terminal 3’ del ADN complementario de dicha construcción viral recombinante
30 (Lindbo, 2007. *BMC Biotechnology*, 7: 52), sin embargo la secuencia de autocorte ribozimático (Rz) que forma parte de la construcción genética no está implicada en el aumento de la expresión del gen correspondiente. Otro ejemplo de construcciones moleculares y métodos para el control de la expresión implican el uso de ribozimas e intrones (WO 2006073727 A2), pero sin embargo, ello no supone el incremento de la expresión de la secuencia de ADN de interés.
40

Por tanto, hasta el momento se siguen buscando sistemas capaces de incrementar la expresión de secuencias nucleotídicas de interés y no se han relacionado ribozimas e intrones con dicho propósito, por tanto, existe un gran interés en generar un sistema genético capaz de incrementar la expresión de dichas secuencias de forma que se consigan incrementos de alrededor de un orden de magnitud, lo que podría implicar una ventaja de enorme interés en la industria biotecnológica.
45

Explicación de la invención

La presente invención se refiere al uso de un polinucleótido para el incremento, en al menos una célula eucariótica, de la expresión de una secuencia nucleotídica aislada en la que está insertado dicho polinucleótido. El polinucleótido comprende una secuencia de autocorte ribozimático insertada en la secuencia de un intrón nuclear no autocatalítico, donde dicha secuencia intrónica debe cumplir unos requisitos mínimos para su correcta escisión durante el madurado del ARN mensajero. Dichos requisitos se especifican más adelante. Asimismo, la presente invención se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia de autocorte ribozimático tipo HHR (*Hammerhead Ribozyme*) procedente de un mamífero insertada en un intrón nuclear no autocatalítico procedente de una planta, donde la secuencia nucleotídica del intrón cumple con dichos requisitos mínimos y dicho polinucleótido está insertado en una secuencia nucleotídica aislada, así como el uso de dicho polinucleótido para incrementar la expresión de la secuencia nucleotídica aislada en la que se inserta. La secuencia nucleotídica aislada que aumenta su expresión como consecuencia de la inserción de dicho polinucleótido, puede codificar para una proteína o para una secuencia de ARN maduro no traducible.
50
55
60

Por tanto, la presente invención provee un polinucleótido para incrementar la expresión de cualquier secuencia nucleotídica sin afectar a la secuencia resultante de dicha expresión y procesamiento o maduración del ARN resultante. Así, el empleo del polinucleótido descrito en la presente invención tiene especial utilidad en la transformación de construcciones recombinantes de todo organismo eucariótico que disponga de mecanismo de silenciamiento génico mediado por ARN como por ejemplo, pero sin limitarse, en plantas y animales.
65

La presente invención supone un avance tecnológico relevante para el estado de la técnica al suponer una herramienta que permite obtener mayor cantidad de producto resultante de la expresión de una secuencia nucleotídica aislada de interés, respecto de las herramientas conocidas hasta el momento. El uso del polinucleótido descrito en la presente invención tiene aplicación, por ejemplo, en la obtención de compuestos de valor terapéutico por medio de la técnica conocida como “*molecular pharming*” o “*biopharming*”, es decir, el uso de células u organismos para la producción de compuestos de interés, o, por otra parte, para aumentar la cantidad de ARN de interferencia empleado en terapias de silenciamiento génico.

Por tanto, la presente invención resuelve eficazmente el problema técnico que plantea la necesidad de sobreexpresar secuencias nucleotídicas de interés ya que, tal como se muestra en el apartado de ejemplos, se consigue mejorar en alrededor de un orden de magnitud la expresión de la secuencia que codifica para la proteína GFP controlada por el promotor constitutivo CMV 35S. Este resultado supone la mejora de la eficacia en la expresión genética respecto de una construcción recombinante que comprende el promotor CMV 35S, que ha sido empleado y se sigue empleando en la actualidad como un procedimiento eficiente para sobre-expresar secuencias nucleotídicas de interés.

Además, en la presente invención se utilizan análisis bioinformáticos, estructurales, bioquímicos y filogenéticos para mostrar la presencia de ribozimas HHRs ultraconservados en genomas de Amniotas (reptiles, pájaros y mamíferos), similares a los descritos previamente en anfibios y parásitos platelmintos. Concretamente, un primer motivo HHR conservado desde aves hasta humanos se localizó en un intrón del gen RECK, que codifica para un factor clave en angiogenesis y supresión de tumores. La caracterización *in vitro* de esta HHR confirmó su elevada actividad ribozimática, y un análisis de los ESTs de RECK mostraron eventos de fusión *in vivo* entre los fragmentos de autocorte del intrón y fragmentos de los ARNs U5 y U6 del complejo “espliceosomal”. De manera similar, se encontraron HHRs en un gen para un antígeno tumoral de linfoma cutáneo de células T conservadas en mamíferos desde ornitorrinco hasta humanos. Finalmente, un tercer HHR fue hallado en el primer intrón del gen que codifica para la distrobrevina beta en lagarto y aves, pero ausente en sus ortólogos humanos. De manera conjunta estos resultados apuntan a la existencia de un mecanismo conservado en los Amniotas que actuaría durante la biogénesis del ARN mensajero implicando a ribozimas como por ejemplo los de tipo HHRs.

Se pueden encontrar ejemplos similares de posibles mecanismos co-transcripcionales implicando ribozimas de autocorte, como el ribozima intrónico tipo HDV (Salehi-Ashtiani *et al.*, 2006. *Science*, 313: 1788-1792) y los ribozimas en 3' UTRs como el CoTC (Teixeira *et al.*, 2004. *Nature*, 432: 526-530) y los HHR discontinuas (Martick *et al.*, 2008. *Nature*, 454: 899-902), que refuerzan la función de las secuencias ribozimáticas que forman parte del polinucleótido descrito en la presente invención. Además, la ausencia de estos ribozimas en los genes ortólogos de metazoos inferiores sería un indicador de que la adquisición y regulación de estos pequeños dominios de ARN con autocorte habría jugado un papel clave durante la evolución de organismos pluricelulares.

Además, los resultados mostrados en la presente invención permiten concluir que los HHR detectados de forma ultraconservada en vertebrados superiores (reptiles, aves y mamíferos), así como en otras especies de metazoos, plantas o eucariotas inferiores como protistas, pueden desempeñar un papel similar en el procesado del transcrito primario del ARN o pre-ARN mensajero. Muy probablemente, dicho procesado tiene como efecto más inmediato que el ARN mensajero resultante codificado por la secuencia aislada en la que se inserta el polinucleótido descrito en la invención, se acumule en mayores niveles que en el control, bien por un incremento en la eficiencia de procesado y maduración del mismo, o más probablemente porque el ARN mensajero resultante obtiene una marcada estabilidad frente a los procesos de degradación endógenos de dicho ARN, como por ejemplo el de silenciamiento génico. Dicho de otra forma, la presencia del polinucleótido, que comprende la secuencia de autocorte ribozimática insertada en una secuencia intrónica, en una construcción recombinante, permite que el ARN mensajero resultante de la transcripción de la misma mantenga de forma eficiente determinadas “marcas proteicas” (por ejemplo pero sin limitarse, el *Exon Junction Complex*). Dichas “marcas” pueden permitir que el ARN mensajero se comporte como cualquier ARN endógeno y por tanto no provoque la activación de la maquinaria de silenciamiento génico al alcanzar determinados niveles de expresión, algo que sí ocurre con los ARN mensajeros resultantes de la expresión con ADN codificantes recombinantes habituales, que no comprenden dicho polinucleótido.

Teniendo en cuenta esta argumentación, cualquier secuencia de autocorte ribozimática insertada en cualquier secuencia intrónica nuclear no autocatalítica que cumpla los requisitos mínimos necesarios indicados en apartados posteriores para su correcta escisión, puede incrementar la expresión de una secuencia nucleotídica aislada, donde dicho polinucleótido está insertado en cualquier posición nucleotídica de la misma. Además, es conocido en el estado de la técnica que los pequeños ribozimas de autocorte catalizan *in vivo* idéntica reacción química (ruptura de la cadena de ARN mediante transesterificación de un enlace fosfodiéster), por lo que cualquier secuencia de autocorte ribozimática podría resolver el problema técnico de la misma manera que en la presente invención.

Para ilustrar la resolución al problema técnico, los inventores de la presente invención construyeron un polipéptido recombinante heterólogo que comprende la secuencia de autocorte ribozimático que codifica para un ribozima HHR de humanos (HH9), insertada en un intrón del gen ST-LS1 de patata (*Solanum tuberosum*). Este polipéptido recombinante fue insertado en la posición nucleotídica 174 de la secuencia que codifica para la proteína GFP, a modo de ejemplo, sin pretender limitar la inserción en cualquier otra posición. Dicha construcción se transformó en plantas de la especie *Nicotiana benthamiana* mediante agroinfiltración y se cuantificó la expresión de la secuencia que codifica para la proteína GFP respecto de diferentes controles. Tanto el gen que codifica para la proteína GFP, como

ES 2 370 214 A1

el promotor CaMV 35S, como la planta en la que se transforma la construcción, son utilizadas de forma habitual en biología molecular y celular de plantas, por tanto, esto no debe suponer una limitación a este tipo de componentes empleados, sino que deben ser tomados como modelos experimentales que demuestran el funcionamiento esencial de la invención.

5 Así, un aspecto de la presente invención se refiere al uso de un polinucleótido aislado que comprende una secuencia nucleotídica, que codifica para al menos una secuencia de autocorte ribozimático, donde dicha secuencia de autocorte ribozimático:

- 10 a. está insertada en cualquier posición nucleotídica de un intrón nuclear no autocatalítico, donde a su vez la secuencia nucleotídica del intrón:
- 15 i. comienza en el extremo 5' con los nucleótidos GY, donde Y es C o T (C o U en su versión de ARN),
 - ii. termina en el extremo 3' con los nucleótidos AG, y
 - iii. comprende la secuencia consenso YTNAN (YUNAN en su versión de ARN), donde N es A, C, G o T (A, C, G o U en ARN),
- 20 b. y además dicha secuencia de autocorte ribozimático está incluida al menos, en la cadena sentido de dicho polinucleótido,

para el incremento de la expresión de una secuencia nucleotídica aislada, en al menos una célula eucariótica, respecto de un control, donde además, dicho polinucleótido está insertado en cualquier posición de dicha secuencia nucleotídica que incrementa su expresión.

Preferiblemente la secuencia consenso del apartado (iii) está situada en una posición nucleotídica entre el nucleótido 3 y 100 de la secuencia del intrón, tomando como nucleótido 1 el nucleótido terminal G del extremo 3' del intrón.

El término "secuencia de autocorte ribozimático" se refiere a la secuencia nucleotídica que codifica para un ribozima, molécula de ARN con capacidad catalítica. En adelante, para referirnos a la secuencia de autocorte ribozimático se puede emplear el término "ribozima" o "secuencia ribozimática". Dicho ribozima es capaz de catalizar el autocorte de una secuencia de ARN intrónica en la que se encuentra insertada la secuencia ribozimática. Para que dicho autocorte se produzca es necesario que la secuencia nucleotídica del intrón en la que está insertado el ribozima cumpla los requisitos mínimos especificados en los apartados (i), (ii) e (iii), necesarios para su escisión completa durante su transcripción nuclear en una célula eucariótica. El ribozima puede ser de origen natural o artificial. El ribozima de origen natural se selecciona de la lista de ribozimas que comprende, pero sin limitarse, ribozima tipo "cabeza de martillo" (en adelante se puede utilizar el término en inglés "*hammerhead*"), *hairpin*, hepatitis-delta, ARN ribosómico 23S peptidiltransferasa, RNasa P (ARNasa P), GIR1, HDV, CPEB3, VS, glmS o CoTC. El ribozima de origen artificial puede ser, pero sin limitarse, tipo *leadzyme*. El término "al menos una secuencia de autocorte ribozimático" se refiere a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 secuencias de autocorte ribozimático unidas entre sí y donde dichas secuencias pueden ser copias de la misma secuencia unidas en tándem o combinaciones de diferentes secuencias de autocorte ribozimático.

La secuencia ribozimática está insertada en cualquier posición nucleotídica de un intrón nuclear no autocatalítico. El término "intrón nuclear no autocatalítico" se refiere a un intrón presente en las células eucariotas, que no es capaz de catalizar la autoescisión de su secuencia sino que dicho procesamiento depende de la actividad catalítica de otras secuencias.

La secuencia nucleotídica del intrón debe comenzar en el extremo 5' con los nucleótidos GY, donde Y es C o T (C o U en su versión de ARN), terminar con los nucleótidos AG en el extremo 3', y comprender la secuencia consenso YTNAN (YUNAN en su versión de ARN), donde N es A, C, G o T (A, C, G o U en ARN). Es decir, la secuencia del intrón nuclear no autocatalítico tiene la estructura 5' GY-----YTNAN----AG 3'. Como ya se ha comentado en un párrafo precedente, preferiblemente la secuencia consenso YTNAN está situada en una posición nucleotídica entre el nucleótido 3 y 100 de la secuencia del intrón, tomando como nucleótido 1 el nucleótido terminal G del extremo 3' del intrón.

Además, la secuencia ribozimática está incluida al menos, en la cadena sentido de dicho polinucleótido. La cadena sentido de un polinucleótido de ADN es la cadena que sirve de molde para la transcripción al transcrito primario de ARN. Por tanto, la secuencia ribozimática o ribozima debe estar necesariamente en dicha cadena y opcionalmente además en la cadena antisentido.

El polinucleótido descrito se inserta en cualquier posición de una secuencia nucleotídica aislada. Como puede observarse en el apartado de ejemplos, dicha inserción produce un incremento de la expresión de la secuencia nucleotídica aislada, respecto de un control. Tal como se muestra en dichos ejemplos, el control respecto del que se incrementa la expresión de la secuencia nucleotídica puede ser al menos una célula eucariótica (u organismo que la

ES 2 370 214 A1

contiene) que no contiene el polinucleótido descrito en párrafos anteriores, o que contiene un polinucleótido truncado en un nucleótido esencial del mismo, u otro tipo de control, de forma que los niveles de expresión de la secuencia nucleotídica aislada en la cual se inserta el polinucleótido descrito son mayores que los niveles de expresión en el control de dicha secuencia nucleotídica aislada. De esta forma, el término “incremento de la expresión” no es ambiguo ya que se refiere a la expresión comparada con un control. En los ejemplos de la invención se obtienen niveles de expresión de la secuencia que codifica para GFP incrementados hasta un orden de magnitud respecto de los niveles de expresión de dicha secuencia en un control.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso del polinucleótido para incrementar la expresión de una secuencia nucleotídica, respecto de un control, donde el polinucleótido comprende una secuencia nucleotídica que codifica para una sola secuencia aislada de autocorte ribozimático. Es decir, el polinucleótido comprende una secuencia nucleotídica que codifica para una sola copia de una secuencia de autocorte ribozimático.

Otra realización preferida se refiere al uso del polinucleótido para incrementar la expresión de una secuencia nucleotídica, respecto de un control, donde la secuencia de autocorte ribozimático procede de un animal amniota. Una realización más preferida se refiere al polinucleótido donde la secuencia de autocorte ribozimático procede de un mamífero. Una realización aún más preferida se refiere al uso del polinucleótido, donde la secuencia de autocorte ribozimático que procede de un mamífero es de tipo “cabeza de martillo” (HHR). Según otra realización aún más preferida de la presente invención, la secuencia de autocorte ribozimático tipo HHR es SEQ ID NO: 1 o cualquiera de sus homólogos en cualquier animal amniota. Dentro de la homología de secuencia se distinguen dos tipos de homología: la ortología y la paralogía. Las secuencias ortólogas pertenecen a especies que tienen un antepasado común. Las secuencias parálogas son aquellas que se encuentran en el mismo organismo y una procede de la duplicación de la otra. En esta realización preferida de la presente invención se consideran todas las secuencias homologas, tanto ortólogas como parálogas, que tienen la misma función que la secuencia SEQ ID NO: 1.

En el apartado de ejemplos se muestra la presencia de ribozimas HHRs ultraconservados en genomas de Amniotas (reptiles, pájaros y mamíferos), similares a los descritos previamente en anfibios y parásitos platelmintos. Por tanto, estos resultados apuntan a la existencia de un mecanismo conservado en los Amniotas que actuaría durante la biogénesis del RNA mensajero implicando a cualquier tipo de ribozimas HHRs.

Otra realización preferida se refiere al uso del polinucleótido para incrementar la expresión de una secuencia nucleotídica, respecto de un control, donde el intrón nuclear no autocatalítico procede de un organismo vegetal. Según otra realización preferida el organismo vegetal es una planta. Según una realización más preferida la planta es del género *Solanum* y más preferiblemente la planta es de la especie *Solanum tuberosum*. Una realización aún más preferida de la presente invención se refiere al uso del polinucleótido, donde el intrón nuclear no autocatalítico es un intrón del gen ST-LS1 (de las siglas en inglés *Solanum tuberosum leaf and stem specific*) o de cualquiera de los homólogos de dicho gen en plantas. Según una realización todavía más preferida, el intrón es SEQ ID NO: 2 o cualquiera de sus homólogos en plantas. La secuencia SEQ ID NO: 2 corresponde a la secuencia del segundo intrón del gen ST-LS1. Para facilitar la inserción en esta secuencia SEQ ID NO: 2 de la secuencia de autocorte ribozimático, se llevaron a cabo unas modificaciones de la secuencia de dicho intrón (Zhao *et al.*, 2001. *J Gen Virol*, 82: 1491-7) conteniendo los siguientes cambios nucleotídicos: cambio de TT en las posiciones 3 y 4 de dicha secuencia SEQ ID NO: 2 por AA, cambio de TT en las posiciones 192 y 193 por GC e inserción de la secuencia GGATC reconocida por la enzima de restricción *Bam*HI en la posición 95 de la secuencia SEQ ID NO: 2. Esta secuencia modificada de SEQ ID NO: 2 se ha llamado SEQ ID NO: 4 y se presenta en la lista de secuencias adjunta.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso del polinucleótido donde además, la secuencia nucleotídica que incrementa su expresión está unida funcionalmente en su extremo 5' a una secuencia reguladora de la expresión génica.

En la presente invención, el término “secuencia reguladora de la expresión génica” hace referencia a una secuencia de ácidos nucleicos que tenga efecto sobre la funcionalidad de la secuencia nucleotídica a la que está unida, en lo que se refiere al comienzo de la transcripción de una secuencia de ADN o al inicio de traducción de una secuencia de ARN u otras secuencias no descritas.

A modo de ejemplo, entre las secuencias reguladoras de la expresión génica contempladas en la presente invención están los promotores u otras menos comunes como determinados intrones. La secuencia reguladora de la expresión génica puede ser la secuencia de un promotor constitutivo o inducible. Según una realización más preferida, dicha secuencia reguladora de la expresión génica es un promotor constitutivo. Según otra realización aún más preferida, el promotor constitutivo es el promotor 35S del virus del mosaico de plantas, por ejemplo el virus de mosaico del tabaco o el virus del mosaico de la coliflor.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso del polinucleótido para incrementar la expresión de una secuencia nucleotídica, respecto de un control, donde la célula eucariótica es de un organismo vegetal. Según una realización más preferida, el organismo vegetal es una planta. Según otra realización aún más preferida, la planta es de la familia *Solanaceae*. Preferiblemente la planta es del género *Nicotiana* y más preferiblemente la planta es de la especie *Nicotiana benthamiana*.

ES 2 370 214 A1

En la presente invención, el término “polinucleótido” se refiere a la secuencia de ácidos nucleicos, es decir, tanto ADN como ARN.

5 En adelante, para hacer referencia a cualquier polinucleótido descrito en párrafos anteriores se puede utilizar la expresión “polinucleótido de la invención” o “polinucleótido de la presente invención”.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la invención y la secuencia nucleotídica aislada en la que se inserta, para el incremento de la expresión de dicha secuencia nucleotídica en al menos una célula eucariótica, respecto de un control. El término “vector de expresión” se refiere a un fragmento de ADN que tiene la capacidad de replicarse en una célula huésped y puede servir de vehículo para multiplicar y expresar otro fragmento de ADN que haya sido fusionado al mismo (inserto). Inserto se refiere a un fragmento de ADN que se fusiona al vector. El vector de expresión puede ser un plásmido, cósmido, bacteriófago o vector viral, sin excluir otro tipo de vector que se corresponda con la definición realizada. En adelante, para hacer referencia a cualquier vector descrito en este párrafo se puede utilizar la expresión “vector de la invención” o “vector de la presente invención”.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una célula eucariótica aislada modificada genéticamente que comprende: el polinucleótido de la invención y la secuencia nucleotídica aislada en la que está insertado, de forma estable o transitoria; o el vector de la invención, para el incremento de la expresión de la secuencia nucleotídica en la que está insertado dicho polinucleótido, respecto de un control. En adelante, para hacer referencia a cualquier célula eucariótica aislada modificada genéticamente descrita en este párrafo se puede utilizar la expresión “célula eucariótica de la invención” o “célula eucariótica de la presente invención”.

25 La célula eucariótica de la invención puede ser una célula de levadura, una célula aislada de un mamífero (preferiblemente el mamífero es un humano), o una célula vegetal y dentro de este grupo, más preferiblemente, una célula perteneciente al reino Plantae. Así pues, la célula vegetal puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una célula del parénquima o una célula meristemática, donde dicha célula está diferenciada o indiferenciada. Asimismo, también se incluye en esta definición de célula vegetal un protoplasto, es decir, la célula de una planta que carece de pared celular.

30 Un aspecto más de la presente invención se refiere al uso de una planta modificada genéticamente que comprende: el polinucleótido de la invención y la secuencia nucleotídica en la que está insertado, de forma estable o transitoria; el vector de la invención; o la célula eucariótica de la invención, para el incremento de la expresión de la secuencia nucleotídica en la que está insertado dicho polinucleótido, respecto de un control. En adelante, para hacer referencia a cualquier planta modificada genéticamente descrita en este párrafo se puede utilizar la expresión “planta de la invención” o “planta de la presente invención”. El término “planta” engloba cada una de las partes de la misma, que pueden ser conservadas o cultivadas de forma aislada o en combinación.

40 Tanto la célula eucariótica de la invención como la planta de la invención, pueden contener el polinucleótido o el vector de la invención, en homocigosis, heterocigosis o hemicigosis.

45 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de germoplasma de la planta de la invención, para el incremento de la expresión de la secuencia nucleotídica en la que está insertado dicho polinucleótido, respecto de un control. En adelante, para hacer referencia a cualquier planta modificada genéticamente descrita en este párrafo se puede utilizar la expresión “germoplasma de la invención” o “germoplasma de la presente invención”.

50 El término “germoplasma” se refiere al material biológico que contiene la variabilidad genética intraespecífica o a los materiales genéticos que pueden perpetuar una especie o una población de un organismo. Así pues, germoplasma es la semilla, tejido de cualquier parte de la planta cultivado *ex vivo* o plantas establecidas en colecciones *ex situ*, sin excluir cualquier otro material que entre en esta definición.

55 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de polen que comprende la célula eucariótica de la invención, para el incremento de la expresión de la secuencia nucleotídica en la que está insertado dicho polinucleótido, respecto de un control. En adelante, para hacer referencia al polen que comprende cualquier célula eucariótica de la invención, descrito en este párrafo, se puede utilizar la expresión “polen de la invención” o “polen de la presente invención”.

60 Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso del polinucleótido de la invención para incrementar la expresión de una secuencia nucleotídica, respecto de un control, donde la secuencia nucleotídica aislada en la que está insertado dicho polinucleótido, codifica para al menos una proteína. El polinucleótido de la invención se inserta en cualquier posición de la secuencia nucleotídica aislada que codifica para la proteína. La posición nucleotídica en la que se inserta incluye las regiones no codificantes (UTRs) que preceden (5' UTR) o incluso continúan (3' UTR) a la secuencia nucleotídica codificante. La elección de la posición en la que se inserta el polinucleótido de la invención no es esencial. Pueden obtenerse incrementos similares en la expresión de la secuencia nucleotídica aislada insertando el polinucleótido de la invención en otras posiciones nucleotídicas diferentes de la posición nucleotídica 174 de la secuencia codificante del gen GFP.

65 Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso del polinucleótido de la invención para incrementar la expresión de una secuencia nucleotídica, respecto de un control, donde la secuencia nucleotídica aislada en la que está insertado dicho polinucleótido, codifica para al menos un ARN maduro no traducible. Dicho ARN maduro

ES 2 370 214 A1

no traducible puede contener, pero sin limitarse, ARN de interferencia (RNAi), ribozimas u otras formas de ácidos ribonucleicos con interés biológico y/o biotecnológico. La interferencia de ARN es un sistema de degradación del ARN mensajero mediado por ARN de doble cadena que permite el silenciamiento específico de determinados genes. Los siRNAs (de las siglas en inglés *small interference RNA*) son moléculas de RNA doble hebra (dsRNA de las siglas en inglés *double strand RNA*) de alrededor de 20 nucleótidos, que se originan a partir de un dsRNA precursor más largo. Los dsRNAs precursores pueden ser de origen endógeno, en cuyo caso se habla de miRNA (codificados en el genoma del organismo) o de origen exógeno (como virus o transgenes). Tanto siRNA como miRNA son dos tipos de RNAi. El RNAi suprime la expresión post-transcripcional de un determinado ARN mensajero reconocidos por la secuencia de RNAi.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia nucleotídica, que codifica para al menos una secuencia aislada de autocorte ribozimático tipo HHR procedente de un mamífero, donde dicha secuencia de autocorte ribozimático:

- a. está insertada en cualquier posición nucleotídica de un intrón nuclear no autocatalítico procedente de una planta, donde la secuencia nucleotídica del intrón:
 - i. comienza en el extremo 5' con los nucleótidos GY, donde Y es C o T,
 - ii. termina en el extremo 3' con los nucleótidos AG, y
 - iii. comprende la secuencia consenso YTNAN, donde N es A, C, G o T.
 - b. y está incluida al menos, en la cadena sentido de dicho polinucleótido,
- donde además, dicho polinucleótido está insertado en cualquier posición de una secuencia nucleotídica aislada.

Tal como se ha mencionado anteriormente, preferiblemente la secuencia consenso del apartado (iii) está situada en una posición nucleotídica entre el nucleótido 3 y 100 de la secuencia del intrón, tomando como nucleótido 1 el nucleótido terminal G del extremo 3' del intrón.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al polinucleótido que comprende una secuencia aislada de autocorte ribozimático tipo HHR procedente de un mamífero insertada en un intrón nuclear no autocatalítico procedente de una planta, donde la secuencia de autocorte ribozimático tipo HHR procede de un humano y el intrón nuclear no autocatalítico procede de un gen de una planta del género *Solanum*. Otra realización preferida de la presente invención se refiere al polinucleótido, donde la secuencia de autocorte ribozimático tipo HHR es SEQ ID NO: 1 o cualquiera de sus homólogos en cualquier animal mamífero. Según otra realización preferida, el intrón nuclear no autocatalítico es un intrón del gen ST-LS1 o de cualquiera de los homólogos de dicho gen en plantas. En una realización más preferida, dicho intrón nuclear no autocatalítico del gen ST-LS1 es la secuencia SEQ ID NO: 2 o cualquier secuencia homóloga de una planta.

Otra realización aún más preferida se refiere al polinucleótido que comprende una secuencia aislada de autocorte ribozimático tipo HHR procedente de un mamífero insertada en un intrón nuclear no autocatalítico procedente de una planta, donde dicho polinucleótido tiene la secuencia SEQ ID NO: 3. Dicho polinucleótido puede tener modificaciones en la secuencia que no impliquen cambio en la función atribuida en la presente invención. Las secuencias SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 tienen sustituida la Timina de la posición nucleotídica 101 de la secuencia SEQ ID NO: 4 por la secuencia SEQ ID NO: 1.

En adelante, para hacer referencia a cualquier polinucleótido que comprende una secuencia aislada de autocorte ribozimático tipo HHR procedente de un mamífero insertada en un intrón nuclear no autocatalítico procedente de una planta, se puede utilizar la expresión "polinucleótido HHR mamífero-Intrón planta de la invención" o "polinucleótido HHR mamífero-Intrón planta de la presente invención".

Otros aspectos de la presente invención se refieren a:

- a1. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido HHR mamífero-Intrón planta de la invención,
- a2. una célula eucariótica aislada modificada genéticamente que comprende el polinucleótido HHR mamífero-Intrón planta de la invención de forma estable o transitoria, o el vector según a1,
- a3. una planta modificada genéticamente que comprende el polinucleótido HHR mamífero-Intrón planta de la invención de forma estable o transitoria; o el vector según a1; o la célula eucariótica modificada genéticamente según a2,
- a4. germoplasma de la planta según a3, y
- a5. polen que comprende la célula eucariótica según a2.

ES 2 370 214 A1

Un aspecto más de la presente invención se refiere al uso del polinucleótido HHR mamífero-Intrón planta de la invención; del vector según el aspecto a1; de la célula eucariótica según el aspecto a2; de la planta según el aspecto a3; del germoplasma según el aspecto a4; o del polen según el aspecto a5, para el incremento de la expresión de la secuencia nucleotídica en la que está insertado dicho polinucleótido, respecto de un control. Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso, donde la secuencia nucleotídica en la que está insertado dicho polinucleótido codifica para al menos una proteína. Otra realización preferida más se refiere al uso, donde la secuencia nucleotídica en la que está insertado dicho polinucleótido codifica para al menos un ARN maduro no traducible.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para el incremento de la expresión de una secuencia nucleotídica aislada, en al menos una célula eucariótica, respecto de un control, que comprende:

a. Seleccionar un vector de expresión según el aspecto a1,

b. transfectar al menos una célula eucariótica animal aislada o transformar al menos una célula eucariótica vegetal con el vector según el paso (a), y

c. cultivar dicha célula transfectada o transformada según el paso (b), en condiciones adecuadas para la expresión de la secuencia nucleotídica aislada.

La célula transformada con el vector de expresión puede incorporar la secuencia nucleotídica de interés en alguno de los ADN de la célula; nuclear, mitocondrial y/o cloroplástico (en este caso se suele insertar una secuencia de ADN de transferencia [T-DNA] que comprende cualquier polinucleótido de la invención), o, permanecer como parte de un vector que posee su propia maquinaria para autoreplicarse.

La transfección o transformación genética de las células se lleva a cabo por medio de técnicas que forman parte del conocimiento general común. La transformación genética de la célula eucariótica vegetal se lleva a cabo, por ejemplo pero sin limitarse, por electroporación, biolística, *Agrobacterium tumefaciens* o cualquier otra técnica que permita la integración de cualquiera de las secuencias de interés la invención en el ADN de la célula. Mediante estas técnicas se consigue introducir, de forma estable, un vector que incluye cualquiera de las secuencias de la invención, de forma que, tras sucesivas divisiones de la célula, la secuencia incorporada sigue expresándose.

Las células eucarióticas vegetales transformadas pueden someterse a un programa de organogénesis o embriogénesis somática mediante el cual, tras la dediferenciación de las mismas mediante una combinación adecuada de hormonas vegetales y otros compuestos, se da lugar a una planta completa que contiene el material genético de la célula original de la que procede, la cual puede expresar la secuencia nucleotídica aislada de interés.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al método para el incremento de la expresión de una secuencia nucleotídica aislada, en al menos una planta, respecto de un control, que comprende:

a. Seleccionar un vector de expresión según el aspecto a1,

b. transformar cualquier parte de una planta con el vector seleccionado en el paso (a), y

c. cultivar dicha planta o parte de la planta transformada según el paso (b), en condiciones adecuadas para la expresión de la secuencia nucleotídica aislada.

Según el paso (b) de dicho método, se puede llevar a cabo la transformación de cualquier parte de una planta donde dicha parte de la planta puede estar aislada del organismo o no. En este sentido pueden transformarse hojas, órganos reproductores o cualquier otra parte de dicha planta *in vivo*, o puede transformarse cualquier parte de la planta *ex vivo*.

La transformación genética de la planta o de cualquier parte de la planta puede llevarse a cabo por cualquier técnica conocida por el experto en la materia, como por ejemplo pero sin limitarse, por biolística, *Agrobacterium tumefaciens* o cualquier otra técnica que permita la integración de cualquiera de las secuencias de interés de la invención en el ADN de la planta, ya sea éste genómico, cloroplástico o mitocondrial. Asimismo, la planta también puede conseguirse por transferencia de cualquiera de las secuencias de interés de la invención por cruzamiento, es decir, empleando polen de la planta transformada para polinizar cualquier otra planta que no contenga dichas secuencias de la invención o polinizando los gineceos de plantas que contengan cualquiera de las secuencias de interés de la invención con otro polen de plantas que no contengan dichas secuencias. Los métodos para conseguir la planta de la invención no se limitan exclusivamente a los métodos descritos en este párrafo.

Las células transfectadas o transformadas así como la planta transformada, descritas en los métodos de la presente invención, pueden contener el polinucleótido HHR mamífero-Intrón planta de la invención; o el vector según a1; o la célula eucariótica modificada genéticamente según a2, en homocigosis, heterocigosis o hemicigosis.

ES 2 370 214 A1

La selección del vector de expresión según el aspecto a1, puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas por el experto en la materia como por ejemplo, pero sin limitarse;

5 - Selección de células procariotas o eucariotas que contengan el vector de expresión mediante la adición de marcadores de selección al medio de cultivo. La resistencia de estas células a sustancias como los antibióticos está producida por la síntesis de moléculas codificadas por una secuencia contenida en la secuencia del vector.

10 - Digestión con enzimas de restricción mediante las cuales se obtenga un fragmento conocido del polinucleótido descrito en la invención.

15 Las condiciones de cultivo adecuadas para la expresión de la secuencia nucleotídica aislada en ambos métodos son aquellas que permiten el cultivo de la célula eucariótica, o en su caso, de la planta o parte de la planta transformada, y la transcripción de dicha secuencia nucleotídica aislada. La transcripción de la secuencia nucleotídica aislada puede depender de secuencias comprendidas en el vector de expresión tales como secuencias promotoras inducibles que pueden requerir la presencia en el medio de cultivo de compuestos que promuevan el inicio de la transcripción de la secuencia nucleotídica aislada.

20 Una realización preferida se refiere a cualquiera de los métodos anteriores para el incremento de la expresión de la secuencia nucleotídica aislada, donde la secuencia nucleotídica en la que está insertado el polinucleótido HHR mamífero-Intrón planta de la invención, codifica para al menos una proteína. Según otra realización preferida, la secuencia nucleotídica en la que está insertado dicho polinucleótido, codifica para al menos un ARN maduro no traducible.

25 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

30 Descripción de las figuras

35 Fig. 1. Muestra dos experimentos por hibridación *dot-blot* de diluciones seriadas de preparaciones de ARN mensajero obtenidas de plantas agroinfiltradas.

Las diluciones mostradas en la figura son 1/5, 1/25, 1/125, 1/625 y 1/3125.

A, se refiere a la hibridación *dot-blot* en la exposición 1.

40 B, se refiere a la hibridación *dot-blot* en la exposición 2.

Las exposiciones 1 y 2 son dos experimentos independientes de hidridación.

45 Fig. 2. Muestra la cuantificación relativa del aumento de la señal de hibridación para cada construcción con respecto a la construcción con menor señal, GFP-2, como referencia.

La señal de hibridación está expresada en escala logarítmica.

50 Fig. 3. Muestra dos experimentos de hibridación *western-blot* de diluciones seriadas de preparaciones proteicas obtenidas de plantas agroinfiltradas.

55 A. Experimento *Western blot* de plantas agroinfiltradas en ausencia del supresor de silenciamiento HC-Pro.

B. Experimento *Western blot* de plantas agroinfiltradas en presencia del supresor de silenciamiento HC-Pro.

Co-agroinfiltraciones con HC-Pro actúan como un intensificador de la señal total.

60 Las diluciones mostradas en la figura son 1/5, 1/25, 1/125 y 1 /625.

65 Fig. 4. Muestra las diferencias en los niveles de expresión de GFP en hojas de plantas *N. benthamiana* transformadas con la construcción GFP-3 frente a las construcciones GFP-1, -2 y -4.

A. Detalle de una hoja de *N. benthamiana* agroinfiltrada con la construcción GFP-3 que contiene el ribotrón activo (izquierda) frente a GFP-1 que no contiene intrón alguno (derecha).

B. Detalle de una hoja de *N. benthamiana* agroinfiltrada con la construcción GFP-3 que contiene el ribotrón activo (izquierda) frente a GFP-2 que contiene el el intrón (derecha).

5 C. Detalle de una hoja de *N. benthamiana* agroinfiltrada con la construcción GFP-3 que contiene el ribotrón activo (izquierda) frente a GFP-4 que contiene el ribotrón inactivo (derecha).

10 Fig. 5. Muestra los halos de silenciamiento detectados en hojas de plantas *N. benthamiana* 16C transformadas con construcciones GFP-1 a -4.

Ejemplos

15 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores. Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos no pretenden limitar el campo de aplicación de la misma.

20 Ejemplo 1

Incremento de la expresión del gen GFP

25 1.1. Descripción de las construcciones utilizadas

A partir de plásmidos binarios pMOG800 utilizados en la agroinfiltración de plantas de *Nicotiana benthamiana* con *Agrobacterium tumefaciens*, se llevaron a cabo 4 construcciones distintas diseñadas todas ellas para la expresión de la *Green Fluorescent Protein* (GFP) procedente de medusa *Aequorea victoria*.

30 Una primera de estas construcciones, GFP-1, corresponde a una construcción estándar conteniendo el ADN complementario (cDNA) de la proteína GFP bajo el control de un doble promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CMV o CaMV) y el terminador del gen inhibidor de proteasa II de *Solanum tuberosum* (PopIt). La secuencia de esta construcción es SEQ ID NO: 5.

35 Una segunda construcción utilizada, GFP-2, consiste en una modificación de la anterior tal y como se ha descrito en la literatura (Zhao *et al.*, 2001. *J Gen Virol*, 82: 1491-1497) que contiene el cDNA de GFP al que se le ha insertado la secuencia del segundo intrón presente en el gen ST-LS1 de *Solanum tuberosum*. La secuencia de esta construcción es SEQ ID NO: 6. Resultados *in vivo* en plantas transformadas descritos previamente muestran que el pre-ARN mensajero resultante de dicha construcción era correctamente vehiculizado al nucleolo, procesado, y el ARN mensajero resultante, es exportado al citoplasma y traducido a GFP (Zhao *et al.*, 2001. *J Gen Virol*, 82: 1491-1497), aunque hasta 40 la fecha no se ha caracterizado el efecto de dicho intrón sobre la eficiencia del proceso de expresión.

La construcción GFP-3 es la resultante de introducir una modificación en el intrón de la construcción GFP-2. Dicha modificación consistió en la sustitución de una Timina en la zona central del intrón por un fragmento de 64 nt, correspondiente a la secuencia del ribozima intónico HH9 encontrado en el gen RECK humano. La secuencia de esta construcción es SEQ ID NO: 7. Durante la transcripción, este ribozima cataliza el autocorte eficiente del intrón que la contiene, y es por ello que a la combinación de un intrón con un dominio ribozimático se podrá denominar de aquí en adelante “ribotrón”. El término ribotrón es sinónimo al término polinucleótido de la invención.

50 Una última construcción utilizada, GFP-4, consistió en un control negativo de GFP-3, resultado de la modificación de esta última mediante una mutación puntual de uno de los nucleótidos conservados en la caja catalítica del ribozima HH9 que implica la práctica abolición de las capacidades autocatalíticas del mismo. La mutación es la delección de la Timina de la posición nucleotídica 16 de HH9 (SEQ ID NO: 1) o la delección de la Timina de la posición 290 de la secuencia SEQ ID NO: 7. La secuencia de esta construcción es SEQ ID NO: 8. Por tanto, las construcciones GFP-3 y 55 GFP-4 únicamente se diferenciaron en un sólo nucleótido que anulaba la actividad ribozimática en GFP-4.

1.2. Efecto de un ribotrón en los niveles de la señal de GFP detectados en plantas transformadas por agroinfiltración transitoria

60 Hojas de plantas de *N. benthamiana* transformadas con la construcción GFP-1 dan lugar a lo que consideraremos niveles basales de señal de fluorescencia bajo luz ultravioleta. Cuando se transformó con la construcción GFP-2, las hojas mostraron un marcado descenso en la señal de GFP. Trabajos previos han descrito que la presencia de determinadas secuencias intrónicas naturales pueden promover indistintamente tanto el aumento como el descenso o incluso la ausencia de efecto alguno sobre los niveles de expresión génica de construcciones recombinantes en eucariotas (Le Hir *et al.*, 2003. *TIBS*, 28: 215-220). El sistema utilizado en la presente invención está caracterizado por ser altamente heterólogo, al tratarse de expresión en planta de un cDNA correspondiente a una proteína de origen animal bajo el control de un promotor de expresión viral y a la que se le ha incluido la secuencia de un intrón de un gen de plantas en una posición arbitraria. Es por tanto lógico que la combinación de secuencias tan dispares en una 65

misma construcción diera lugar a una menor señal de expresión debido muy probablemente a una menor eficiencia bien en la transcripción, madurado, exporte, traducción y/o degradado del ARN mensajero.

5 Sin embargo, plantas transformadas con la construcción GFP-3 dieron lugar a un excepcional incremento de la expresión de GFP, muy superior a los niveles obtenidos con la construcción GFP-1 sin intrón alguno, y que por visualización bajo luz ultravioleta indicaron un aumento en la señal de GFP superior al orden de magnitud (Fig. 4).

10 Los niveles de fluorescencia observados para la construcción de GFP-4 conteniendo el ribotrón con el ribozima inactivo fueron claramente inferiores a los niveles observados con las construcciones GFP-1 y GFP-3, aunque ligeramente superiores a lo observado con GFP-2. Este resultado nos permite concluir que el efecto en la sobre-expresión observado con ribotrón no es debido a la existencia de un intrón en la construcción *per se*, sino a la presencia del ribozima embebida en el mismo que además debe de ser catalíticamente activa.

15 1.3. Cuantificación de los niveles del ARN mensajero correspondiente a la GFP en planta; ensayos de Hibridación Northern

Experimentos por hibridación *Northern* con una sonda específica para el ARN mensajero de GFP fueron concluyentes. Se pudo comprobar que los niveles de acumulación para la construcción GFP-3 se habían incrementado en más de 6 veces ($6,21 \pm 0,73$) con respecto a los niveles de ARN mensajero de la construcción estándar GFP-1. De manera más sorprendente, los niveles de ARN mensajero de las construcciones GFP-2 y GFP-4 se vieron reducidos en 454 ($0,0022 \pm 0,0001$) y 116 ($0,0086 \pm 0,0003$) veces respectivamente en referencia a la construcción GFP-1.

25 1.4. Cuantificación de los niveles de proteína GFP en planta; ensayos por Western blot

Las diferencias detectadas previamente por hibridación del ARN mensajero para cada construcción se correspondieron cualitativamente, aunque no cuantitativamente, con las diferencias observadas en los niveles de proteína detectados por análisis *Western* con anticuerpos específicos contra la GFP.

30 Así, la construcción GFP-2 mostró un descenso en los niveles de expresión proteica superior a cinco veces con respecto a GFP-1 ($0,18 \pm 0,01$). En la construcción GFP-3 con ribotrón activo se detectaron incrementos de la expresión proteica cercanos al 600% ($5,96 \pm 0,28$ veces) respecto a GFP-1. La construcción GFP-4 vio reducida la expresión proteica a $0,28 \pm 0,09$ veces la expresión observada para GFP-1. Estas diferencias se vieron reducidas en el caso de llevar a cabo las agroinfiltraciones en presencia de un inhibidor del silenciamiento génico (HC-pro) de la planta. 35 Dicho inhibidor se suele co-infiltrar de manera rutinaria en los experimentos de laboratorio con objeto de obtener mejores rendimientos de expresión. El hecho de observar claras diferencias de expresión entre transformaciones sin y con inhibidor del silenciamiento génico estaría indicando que el mecanismo de defensa endógeno frente a ARNs exógenos por silenciamiento podría estar implicado en los efectos observados en los experimentos mostrados en la presente invención.

40 Así, se pudo comprobar que de hecho la co-agroinoculación de HC-Pro con las correspondientes construcciones apenas tuvo efecto en los niveles acumulación de GFP-3, y si fue más marcado para el resto de construcciones GFP-1, -2 y -4 (Fig. 3).

45 1.5. Ausencia de la señal de degradación por silenciamiento génico: Plantas de *N. benthamiana* 16C. Halos de silenciamiento

Plantas 16C, correspondientes a plantas de *Nicotiana benthamiana* transformadas de forma estable para expresar de forma endógena y constitutiva la proteína GFP, fueron utilizadas para agroinfiltración con las construcciones GFP-1 a -4. Este experimento permitió visualizar la activación de la señal de silenciamiento en la expresión de GFP endógena mediante la aparición de un halo de silenciamiento (zona de “apagado” de la GFP endógena) que rodea a la zona de expresión transitoria con las construcciones agroinfiltradas (Fig. 5). De esta forma, y a los pocos días de realizar las transformaciones, se pudo comprobar que mientras que las construcciones GFP-1, 2 y 4 dieron lugar a los típicos halos de silenciamiento esperados, las plantas agroinfiltradas con la construcción ribotónica GFP-3 no mostraron la aparición del halo de silenciamiento. Este resultado es especialmente sorprendente ya que serían justo los elevados niveles de expresión/transcripción de la construcción GFP-3 los que deberían promover con una mayor efectividad la activación del mecanismo de silenciamiento, tal y como viene proponiéndose en la literatura.

60 Material y métodos

Construcciones binarias y ensayos de expresión transitoria en plantas mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*

65 La cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens* fue transformada por electroporación con el vector binario pMOG800 conteniendo el correspondiente cassette de expresión de GFP (GFP-1 a -4) bajo el control del promotor doble 35S CMV y el terminador PopIt.

Hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana* salvajes (WT) o 16C (transformadas establemente con GFP) fueron infiltradas en la cara abaxial con suspensiones de *A. tumefaciens*.

ES 2 370 214 A1

A nivel molecular, el ribotróon utilizado en estos experimentos estuvo compuesto por un intrón de plantas del gen ST-LS1 de plantas de patata conteniendo el ribozima de tipo *hammerhead* humana HH9:

5' AGCCTTACCTGCAGCTGATGAGCTCCAAAAAGAGCGAAACCTATTAGGTCTGCAGTACTGGCT3'
(SEQ ID NO: 1).

Extracción de RNA y Northern blots

Extracciones totales de ácidos nucleicos de hojas agroinfiltradas de *Nicotiana benthamiana* se llevaron a cabo por homogeneizado en presencia de tampón de extracción (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.0, 500 mM NaCl, y 10 mM β -mercaptoethanol), posteriormente incubadas en 20% SDS a 65°C, 20 min, y precipitadas con etanol. RNAs fueron corridos en geles desnaturizantes o directamente transferidos a membranas de nylon. Detección del RNA se llevó a cabo usando una sonda específica de GFP marcada con digoxigenina. La señal de hibridación se detectó por autoradiografía.

RT-PCR

Para las retrotranscripciones, 2 μ l del extracto de ácidos nucleicos previamente desnaturizado por calor en presencia de un oligo antisentido específico de GFP, se añadió a una mezcla de reacción conteniendo 1 \times RT buffer (RevertAid H Minus M-MuLV *Reverse Transcriptase*, Fermentas *Life Sciences*), 1% polivinilpirrolidona (PVP), 40 unidades de inhibidor HPRI de RNAsas (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), 2.5 mM dNTPs y 200 unidades de retotranscriptasa. La reacción se llevó a cabo a 45°C durante 45 min. Reacciones de PCR contuvieron 1/10 RT, 1% PVP; 10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 1.5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 0.2 mM cada dNTP; 10 μ M de oligos específicos para GFP y 3 unidades de Taq ADN polimerasa (Roche *Molecular Biochemicals*, Mannheim, Germany). Las muestras se amplificaron 30 cycles con un *Gene Amp PCR System* 2400 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). Cada ciclo consistió de una desnaturización a 95°C (30 s), anillado a 62°C (30 s), y extensión a 72°C (40 s).

Western blots

Proteínas totales extraídas de *N. benthamiana* agroinfiltradas fueron corridas en geles de SDS-polyacrilamida 12% o directamente transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Las proteínas fueron detectadas con antisuero contra GFP diluido 1:2000. La unión del anticuerpo se detectó por inmunoreacción a la IgG de conejo acoplada a la fosfatasa alcalina, y la posterior detección calorimétrica se llevó a cabo usando NBT-BCIP como sustrato.

Ejemplo 2

Presencia de dominios tipo HHR en genomas de vertebrados

En este ejemplo se muestran los resultados de la búsqueda del dominio de ribozima de cabeza de martillo (HHR). Inicialmente se llevaron a cabo búsquedas bioinformáticas de motivos HHR en el genoma de *Schistosoma mansoni*, cuyo proyecto de secuenciación se ha completado recientemente. De esta forma se localizaron miles (>50,000) de entradas para este ribozima distribuidos por todo el genoma del parásito y no sólo restringido a ADN satélite. A partir de estos resultados se realizaron búsquedas iterativas en genomas de vertebrados, encontrando inicialmente cientos de entradas similares en los genomas de la rana *Xenopus tropicalis* y de la lamprea *Petromyzon marinus*, que aparecieron de manera significativa asociados con ORFs tipo retrotranscriptasa (RT de aquí en adelante), lo que indica su implicación en una forma de elemento retrotransponible. De forma similar, se encontraron ribozimas HHR ultraconservados en intrones de genomas de amniotas (reptiles, aves y mamíferos), lo que sugiere antiguos procesos de “domesticación” de estos pequeños motivos de ARN de autocorte durante la evolución de los vertebrados.

2.1. Motivos HHR tipo esquistosoma se encuentran ampliamente distribuidos en el genoma de anfibios y de lampreas

Gracias a la finalización del proyecto genoma de *Schistosoma mansoni*, los inventores detectaron más de 50.000 entradas para HHRs del tipo II/III similares a las descritas previamente en el ADN satélite Sma α de éste y otros platelmintos parásitos como *S. haematobium* o *S. douthitii*. Estos “hits” se encontraron en todo el genoma del tremátodo y no sólo asociado al ADN repetitivo. Los motivos HHR II/III se detectaron también en el genoma de *S. japonicum*, así como en algunas secuencias de cDNA de otro tremátodo más distante como es *Opisthorchis viverrini*, indicando una conservación del motivo HHR en los genomas de estos platelmintos parásitos. Curiosamente, uno de los cDNAs de *O. viverrini* conteniendo un motivo HHR mostró una homología significativa con una RT de *S. japonicum*.

Tal y como se ha descrito previamente, los genomas de varias especies de tritones y salamandras (orden caudata) contienen motivos HHR II/III en tándem separados por 300 pb en lo que se conoce como ADN satélite de tipo 2, que además son activamente transcritos *in vivo*. Realizando búsquedas BLASTs iterativas con semillas derivadas de motivos HHR de *S. mansoni*, tritones y salamandras se encontraron motivos ribozimáticos similares en los genomas de tres especies más de salamandras y, de manera más destacable, en el genoma de la rana *Xenopus tropicalis*, orden Anura (Tabla 1), sugiriendo una presencia ampliamente distribuida entre anfibios. Búsquedas BLAT en los servidores de UCSC con los motivos HHR completos de *Xenopus tropicalis* reveló la presencia de cientos de estos motivos en

el genoma de la rana, que en ocasiones aparecieron como repeticiones en tándem asociadas a ADN repetitivo (ADN satélite), pero más habitualmente como motivos simples y dispersos en regiones intrónicas y asociados a diferentes ESTs entre los que destacaban los casos de motivos que codifican para putativos factores con actividad RT (Tabla 1). De forma similar, búsquedas BLAST iterativas mostraron la presencia de motivos HHR tipo II/III en el genoma de los peces *Petromyzon marinus* (lamprea marina) y *Lethenteron japonicum* (lamprea ártica). Búsquedas BLAT en el genoma de *P. marinus* confirmaron la presencia de cientos de motivos HHRs simples dispersos en dicho genoma, que en muchos casos se localizaron igualmente en regiones intrónicas o asociadas a ESTs del tipo RT (Tabla 1). Resulta destacable que estos motivos ribozimáticos fueron HHR II/III típicas con una hélice III muy corta (1-2 pb) acabada normalmente en un bucle palindrómico. Dicha disposición evita que el ribozima alcance niveles destacables de auto-corte *in vitro* cuando el ribozima se encuentra en una sola copia, pero no cuando se encuentran como dos copias en tándem (Forster *et al.*, 1988. *Nature*, 334: 265-267), sin embargo no puede descartarse la posibilidad de que actúen *in vivo* como simples a través de versiones extendidas de los motivos HHR o como factores que actúan en trans.

2.3. Un motivo HHR catalíticamente activo y ultraconservado en un intrón de un gen supresor de tumores en vertebrados endotérmicos

Búsquedas bioinformáticas de motivos HHR de esquistosomas, *X. tropicalis* y *P. marinus* se llevaron a cabo sobre el genoma humano completo. De esta forma, se encontró de manera recurrente una entrada común (de aquí en adelante HH9) que localizaba en un contig del cromosoma 9 (Tabla 1). La secuencia adoptaba una estructura HHR del tipo II/III con una hélice III extendida (4 bp) acabada en un tetrabucle no palindrómico, lo que, en conjunto permite a este ribozima alcanzar *in vitro* los niveles típicos de autocorte ($k_{obs} = 2.03 \pm 0.21 \text{ min}^{-1}$ a 25°C, pH 6.5, 1 mM Mg^{2+}) para un motivo HHR natural actuando como un ribozima simple.

En humanos, los inventores han encontrado que HH9 se encuentra en medio de un largo intrón (14 kb) de la ORF que codifica para la glicoproteína de membrana RECK. Esta proteína, descubierta inicialmente por su habilidad para inducir la reversión de fibroblastos activados por ras, se ha comprobado que su función como supresor de tumores es debida a su efecto inhibidor sobre las metaloproteinasas de membrana implicadas en la remodelación de la matriz extracelular (ECM), un paso fisiológico clave durante la embriogénesis y vasculogénesis (Oh *et al.*, 2001. *Cell*, 107: 789-800).

El motivo HH9 está altamente conservado (cerca del 90% de identidad en 60 nt) entre los intrones de los ortólogos de RECK para todas las especies de vertebrados endotérmicos examinadas, una situación que se asemejaría a lo detectado para otros elementos ultraconservados en el genoma humano (Bejerano *et al.*, 2004. *Science*, 304: 1321-1325). De hecho, la heterogeneidad de la secuencia detectada está fundamentalmente restringida a la región de la hélice III y es compatible con una estructura de un HHR catalíticamente activo. Los alineamientos de secuencias en las regiones intrónicas 3' y 5' flanqueantes no muestran grado alguno de conservación en las especies de vertebrados superiores analizadas, lo que indica una clara presión de selección sobre el motivo ribozimático. Análisis de los ESTs de RECK disponibles en las bases de datos mostraron dos ejemplos en *Bos taurus* obtenidos de tejido fetal y de cerebro de ternera que mapean con las secuencias resultantes de un proceso de corte por HHR, aunque mostrando extensiones de 82 y 83 nt respectivamente. Al hacer una búsqueda BLAST con dichas extensiones resultaron ser fragmentos de los ARNs “espliceosomales” U5 y U6 respectivamente. Estas observaciones indican no sólo que HH9 se autocortaría *in vivo*, sino que uno de los productos intrónicos generados interferirían con la maquinaria del “espliceosoma”.

2.4. Un motivo HHR en mamíferos localizado en el primer intrón de un gen antígeno tumoral

Un segundo “hit” encontrado en el genoma humano fue HH10 (Tabla 1), un HHR similar a HH9, con la excepción de la mayor longitud de la hélice III, y que se encontró conservado en la mayoría de los genomas de mamíferos desde ornitorrinco a humanos, con la ausencia de roedores (rata y ratón), lagomorfos (conejo) y cingulata (armadillo). En humanos, el motivo se localiza en el cromosoma 10, y más concretamente, en el primer intrón (10 kb) del gen no caracterizado C10orf118. La proteína codificada en esta ORF corresponde al antígeno tumoral CTCL (*Cutaneous T-Cell Lymphoma*) L14-2, un factor involucrado en procesos de tumorigénesis.

A diferencia de lo observado en HH9, en el alineamiento de las secuencias flanqueantes de HH10 se encontró una mayor conservación de la hélice I en hasta 8 pb extra. De nuevo, los extremos 5' de dos ESTs de cerebro humano coincidieron con esta región intrónica, aunque no exactamente con el sitio de auto-corte sino con el final de la región conservada de la hélice I.

2.5. Un motivo HHR intrónico localizado en el gen de la distrobrevina beta conservado en reptiles y aves

Búsquedas BLAT con los motivos HHR encontrados en humanos revelaron nuevos ejemplos de motivos HHR conservados en *Anolis carolinensis* (reptil), *Gallus gallus* y *Taenopygia guttata* (aves) (HH-DTNB. Tabla I). De nuevo, todos resultaron ser motivos HHR del tipo II/III cuya estructura y secuencia fue muy similar al motivo HH9, aunque curiosamente se detectó una covariación en el tallo I idéntica a la detectada para HH10. Para las tres especies, el HHR se encuentra localizada en el primer intrón (8.7 kb) del gen que codifica para la distrobrevina beta (DTNB), un factor proteico de tejidos cerebrales que interacciona con la distrofina para formar el núcleo del complejo transmembrana de la glicoproteína distrofina (DGC). El análisis bioinformático en los ortólogos de DTNB de mamíferos, muestra la ausencia o pérdida evolutiva del primer intrón/exón presente en aves y reptiles y, en consecuencia, no se ha detectado la presencia del motivo HHR en los genes de mamíferos.

ES 2 370 214 A1

TABLA 1

Presencia de dominios tipo HHR en genomas de vertebrados. Se facilitan los nº de acceso EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) de las secuencias donde están insertadas los ribozimas y las posiciones concretas del inicio de la caja catalítica "CUGANGA" de los HHRs en dichas secuencias

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

<u>Especies</u>	<u>Nº acceso EMBL</u>	<u>Cadena</u>	<u>Origen</u>	<u>Posición</u>
<i>Xenopus Tropicalis</i>	DT447185	+	RNA	663
	DT447184	-	RNA	594
	DN046758	-	RNA	402
	CX851145	+	RNA	168
	CX838586	+	RNA	150
	CX809771	+	RNA	38
	CX804623	+	RNA	190
<i>Ambystoma tigrinum</i>	DN049774	+	RNA	100
	CN047845	+	RNA	87
<i>Ambystoma mexicanum</i>	CO786334	-	RNA	155
<i>Cynops pyrrhogaster</i>	FS293747	-	RNA	541
<i>Petromyzon marinus</i>	EG023975	-	RNA	426
	EB721675	+	RNA	310
	FD713511	+	RNA	217
	CO547793	-	RNA	239
	EG335887	+	RNA	75
	EB718691	-	RNA	67
	FD720012	-	RNA	174
	EC425355	-	RNA	100
	EG338286	+	RNA	214
	EC426782	-	RNA	245
	FD722165	-	RNA	729

ES 2 370 214 A1

	<i>Lethenteron japonicum</i>	DC612391	+	RNA	205
		DC617201	-	RNA	226
5		DC616422	+	RNA	408
	<i>Xenopus tropicalis</i>	Scaffold_375	-	DNA	1057652
		Scaffold_179	-	DNA	1837564
10		Scaffold_68	+	DNA	1984600
		Scaffold_57	-	DNA	1529678
		Scaffold_578	+	DNA	494798
15	<i>Petromyzon marinus</i>	Contig_6481	-	DNA	17053
		Contig_1157	+	DNA	9815
		Contig_19006	+	DNA	8075
20		Contig_42040	+	DNA	441
	<i>Ambystoma mexicanum</i>	CO786334	-	RNA	155
		EU686405	+	DNA	34032
25		EU686414	-	DNA	14206
		EU686401	+	DNA	13346
		EU686400	+	DNA	50341
30		EU686411	+	DNA	70802
		EU686412	+	DNA	152069-
				(doble)	176397
35	<i>Homo sapiens:</i>				
	HH9	ENSG00000122707	+	DNA	36072687
	HH10	ENSG00000165813	-	DNA	66732424
40	<i>Gallus gallus</i>				
	HH-DTNB	ENSGALG000000165	-	DNA	107580157
45		28			

Conclusión

El gran número de HHRs encontrados en esquistosomas no se restringiría al ADN satélite SM α tal y como se había descrito previamente, sino que estos motivos se encontrarían repartidos a lo largo de todo su genoma, destacando casos de HHRs asociados a regiones que codifican para regiones tipo RT. Hay que destacar que algo similar ocurriría en los resultados encontrados para los genomas de la lamprea *P. marinus* y mucho más claramente para la rana *X. tropicalis*, donde los motivos HHR similares a los descritos en el ADN satélite 2 de salamandras o grillos se encontraron claramente asociados a genes con actividad RT. En conjunto, estos hallazgos indicarían que los HHRs están implicadas en un nuevo tipo de elemento transponible de manera equivalente a lo encontrado recientemente para el motivo ribozimático HDV (Webb *et al.*, 2009. *Science*, 326: 953) y muy parecido a lo descrito para los retroposones tipo SINE como los elementos Alu en primates. Hay que recalcar que estos tres motivos (HHR, Alu y HDV) presentan como característica común la presencia de estructuras “triple hélice”, lo que constituiría una primera indicación sobre los mecanismos moleculares implicados en su exitosa integración en los genomas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un polinucleótido aislado que comprende una secuencia nucleotídica, que codifica para al menos una secuencia de autocorte ribozimático, donde dicha secuencia de autocorte ribozimático:
- 10 a. está insertada en cualquier posición nucleotídica de un intrón nuclear no autocatalítico, donde la secuencia nucleotídica del intrón:
 - i. comienza en el extremo 5' con los nucleótidos GY, donde Y es C o T,
 - ii. termina en el extremo 3' con los nucleótidos AG, y
 - 15 iii. comprende la secuencia consenso YTNAN, donde N es A, C, G o T.
 - b. y está incluida al menos, en la cadena sentido de dicho polinucleótido,
para el incremento de la expresión de una secuencia nucleotídica aislada, en al menos una célula eucariótica, respecto de un control, donde además, dicho polinucleótido está insertado en cualquier posición de dicha secuencia nucleotídica que incrementa su expresión.
20
2. Uso según la reivindicación 1, donde el polinucleótido comprende una secuencia nucleotídica que codifica para una sola secuencia de autocorte ribozimático.
- 25 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la secuencia de autocorte ribozimático procede de un animal amniota.
4. Uso según la reivindicación 3, donde la secuencia de autocorte ribozimático procede de un mamífero.
- 30 5. Uso según la reivindicación 4, donde la secuencia de autocorte ribozimático que procede de un mamífero es de tipo "cabeza de martillo" (HHR).
6. Uso según la reivindicación 5, donde la secuencia de autocorte ribozimático tipo HHR es SEQ ID NO: 1 o cualquiera de sus homólogos en cualquier animal amniota.
- 35 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el intrón nuclear no autocatalítico procede de un organismo vegetal.
- 40 8. Uso según la reivindicación 7, donde el organismo vegetal es una planta.
9. Uso según la reivindicación 8, donde la planta es del género *Solanum*.
10. Uso según la reivindicación 9, donde la planta es de la especie *Solanum tuberosum*.
- 45 11. Uso según la reivindicación 10, donde el intrón nuclear no autocatalítico es un intrón del gen ST-LS1 o de cualquiera de los homólogos de dicho gen en plantas.
12. Uso según la reivindicación 11, donde el intrón es SEQ ID NO: 2 o cualquiera de sus homólogos en plantas.
- 50 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde además, la secuencia nucleotídica que incrementa su expresión está unida funcionalmente en su extremo 5' a una secuencia reguladora de la expresión génica.
14. Uso según la reivindicación 13, donde dicha secuencia reguladora de la expresión génica es un promotor constitutivo.
- 55 15. Uso según la reivindicación 14, donde el promotor constitutivo es el promotor 35S del virus del mosaico de plantas.
- 60 16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde la célula eucariótica es de un organismo vegetal.
17. Uso según la reivindicación 16, donde el organismo vegetal es una planta.
18. Uso según la reivindicación 17, donde la planta es de la familia *Solanaceae*.
- 65 19. Uso según la reivindicación 18, donde la planta es del género *Nicotiana*.
20. Uso según la reivindicación 19, donde la planta es de la especie *Nicotiana benthamiana*.

ES 2 370 214 A1

21. Uso de un vector de expresión que comprende el polinucleótido y la secuencia nucleotídica en la que está insertado, descritos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para el incremento de la expresión de dicha secuencia nucleotídica en al menos una célula eucariótica, respecto de un control.

5 22. Uso de una célula eucariótica aislada modificada genéticamente que comprende:

a. el polinucleótido y la secuencia nucleotídica en la que está insertado, descritos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, de forma estable o transitoria, o

10 b. el vector de expresión descrito en la reivindicación 21,

para el incremento de la expresión de la secuencia nucleotídica en la que está insertado dicho polinucleótido, respecto de un control.

15 23. Uso de una planta modificada genéticamente que comprende:

a. el polinucleótido y la secuencia nucleotídica en la que está insertado, descritos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, de forma estable o transitoria,

20 b. el vector de expresión descrito en la reivindicación 21, o

c. la célula modificada genéticamente descrita en la reivindicación 22,

25 para el incremento de la expresión de la secuencia nucleotídica en la que está insertado dicho polinucleótido, respecto de un control.

30 24. Uso de germoplasma de la planta modificada genéticamente descrita en la reivindicación 23, para el incremento de la expresión de la secuencia nucleotídica en la que está insertado dicho polinucleótido, respecto de un control.

25. Uso de polen que comprende la célula eucariótica modificada genéticamente según se describe en la reivindicación 22, para el incremento de la expresión de la secuencia nucleotídica en la que está insertado dicho polinucleótido, respecto de un control.

35 26. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, donde la secuencia nucleotídica aislada en la que está insertado dicho polinucleótido, codifica para al menos una proteína.

40 27. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, donde la secuencia nucleotídica aislada en la que está insertado dicho polinucleótido, codifica para al menos un ARN maduro no traducible.

28. Polinucleótido aislado que comprende una secuencia nucleotídica, que codifica para al menos una secuencia de autocorte ribozimático tipo HHR procedente de un mamífero, donde dicha secuencia de autocorte ribozimático:

45 a. está insertada en cualquier posición nucleotídica de un intrón nuclear no autocatalítico procedente de una planta, donde la secuencia nucleotídica del intrón:

i. comienza en el extremo 5' con los nucleótidos GY, donde Y es C o T,

50 ii. termina en el extremo 3' con los nucleótidos AG, y

iii. comprende la secuencia consenso YTNAN, donde N es A, C, G o T.

b. y está incluida al menos, en la cadena sentido de dicho polinucleótido,

55 donde además, dicho polinucleótido está insertado en cualquier posición de una secuencia nucleotídica aislada.

60 29. Polinucleótido según la reivindicación 28, donde la secuencia aislada de autocorte ribozimático tipo HHR procede de un humano y el intrón nuclear no autocatalítico procede de un gen de una planta del género *Solanum*.

30. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 28 ó 29, donde la secuencia de autocorte ribozimático tipo HHR es SEQ ID NO: 1 o cualquiera de sus homólogos en cualquier animal mamífero.

65 31. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, donde el intrón nuclear no autocatalítico es un intrón del gen ST-LS1 o de cualquiera de los homólogos de dicho gen en plantas.

ES 2 370 214 A1

32. Polinucleótido según la reivindicación 31, donde dicho intrón nuclear no autocatalítico del gen ST-LS1 es la secuencia SEQ ID NO: 2 o cualquier secuencia homóloga de una planta.

5 33. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32, donde dicho polinucleótido tiene la secuencia SEQ ID NO: 3.

34. Vector de expresión que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33.

10 35. Célula eucariótica aislada modificada genéticamente que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33 de forma estable o transitoria, o el vector según la reivindicación 34.

15 36. Planta modificada genéticamente que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33 de forma estable o transitoria; o el vector según la reivindicación 34; o la célula eucariótica modificada genéticamente según la reivindicación 35.

37. Germoplasma de la planta según la reivindicación 36.

38. Polen que comprende la célula eucariótica según la reivindicación 35.

20 39. Uso del polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33; del vector según la reivindicación 34; de la célula eucariótica según la reivindicación 35; de la planta según la reivindicación 36; del germoplasma según la reivindicación 37; o del polen según la reivindicación 38, para el incremento de la expresión de la secuencia nucleotídica en la que está insertado dicho polinucleótido, respecto de un control.

25 40. Uso según la reivindicación 39, donde la secuencia nucleotídica en la que está insertado dicho polinucleótido codifica para al menos una proteína.

30 41. Uso según la reivindicación 39, donde la secuencia nucleotídica en la que está insertado dicho polinucleótido codifica para al menos un ARN maduro no traducible.

42. Método para el incremento de la expresión de una secuencia nucleotídica aislada, en al menos una célula eucariótica, respecto de un control, que comprende:

- 35
- a. Seleccionar un vector de expresión según la reivindicación 34,
 - b. transfectar al menos una célula eucariótica animal aislada o transformar al menos una célula eucariótica vegetal con el vector según el paso (a), y
 - c. cultivar dicha célula transfectada o transformada según el paso (b), en condiciones adecuadas para la expresión de la secuencia nucleotídica aislada.
- 40

43. Método para el incremento de la expresión de una secuencia nucleotídica aislada, en al menos una planta, respecto de un control, que comprende:

- 45
- a. Seleccionar un vector de expresión según la reivindicación 34,
 - b. transformar cualquier parte de una planta con el vector seleccionado en el paso (a), y
 - c. cultivar dicha planta o parte de la planta transformada según el paso (b), en condiciones adecuadas para la expresión de la secuencia nucleotídica aislada.
- 50

44. Método según cualquiera de las reivindicaciones 42 ó 43, donde la secuencia nucleotídica en la que está insertado dicho polinucleótido, codifica para al menos una proteína.

55 45. Método según cualquiera de las reivindicaciones 42 ó 43, donde la secuencia nucleotídica en la que está insertado dicho polinucleótido, codifica para al menos un ARN maduro no traducible.

60

65

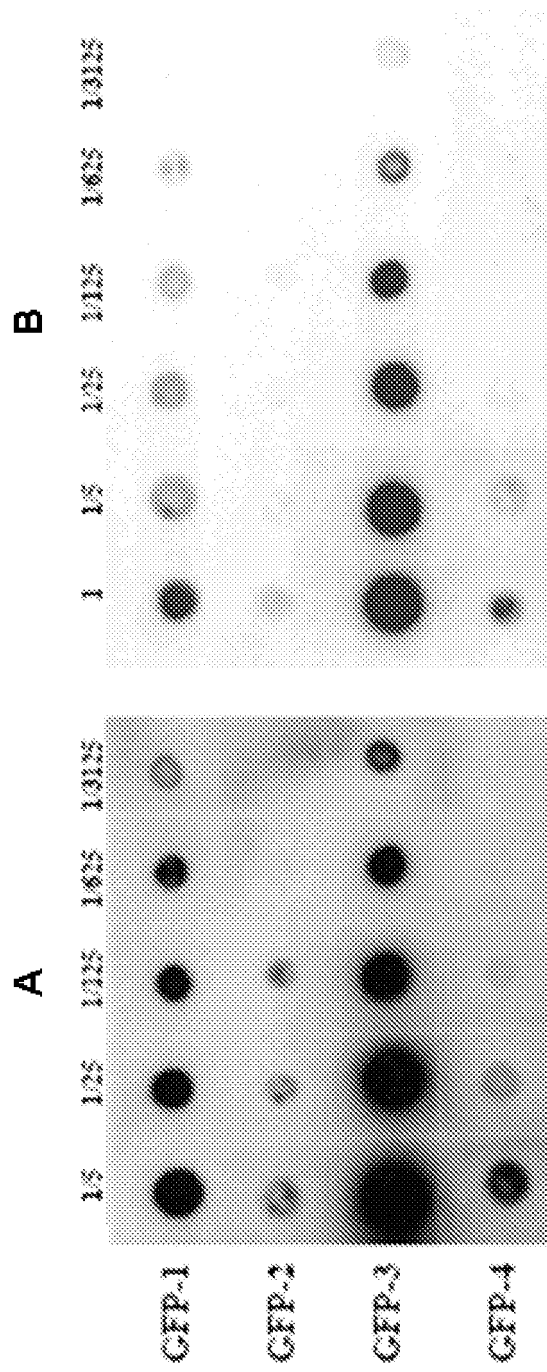


FIG. 1

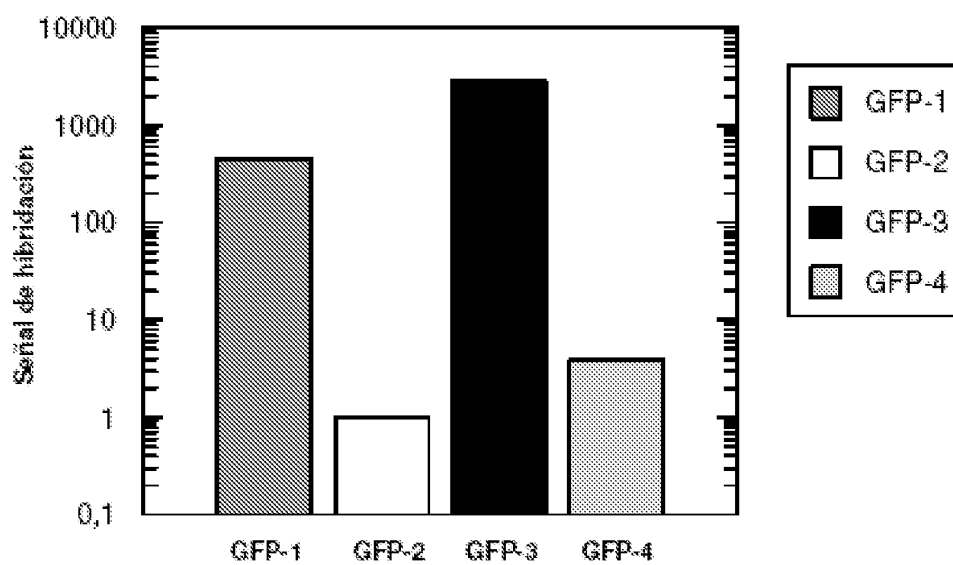


FIG. 2

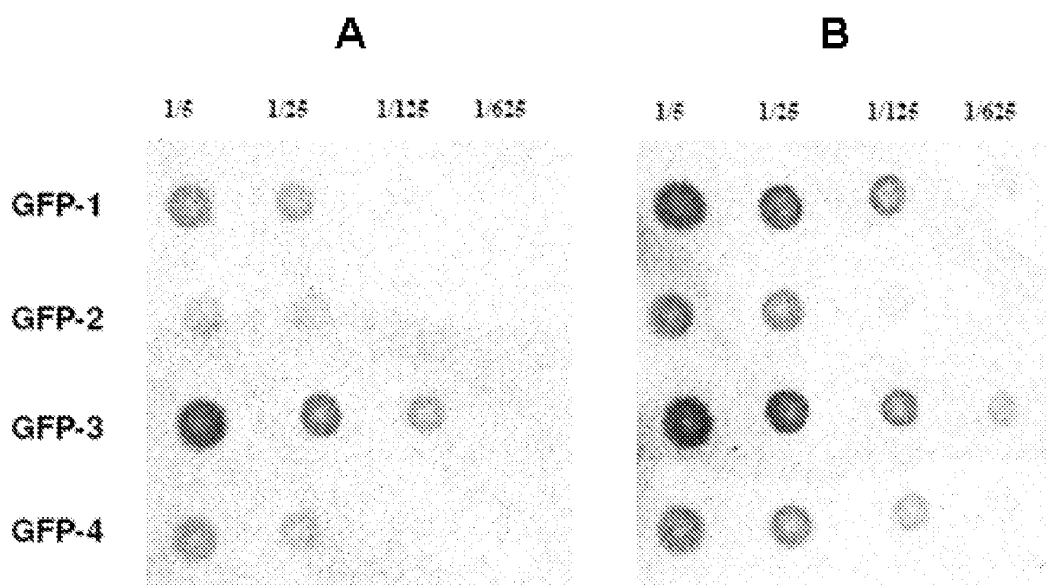


FIG. 3

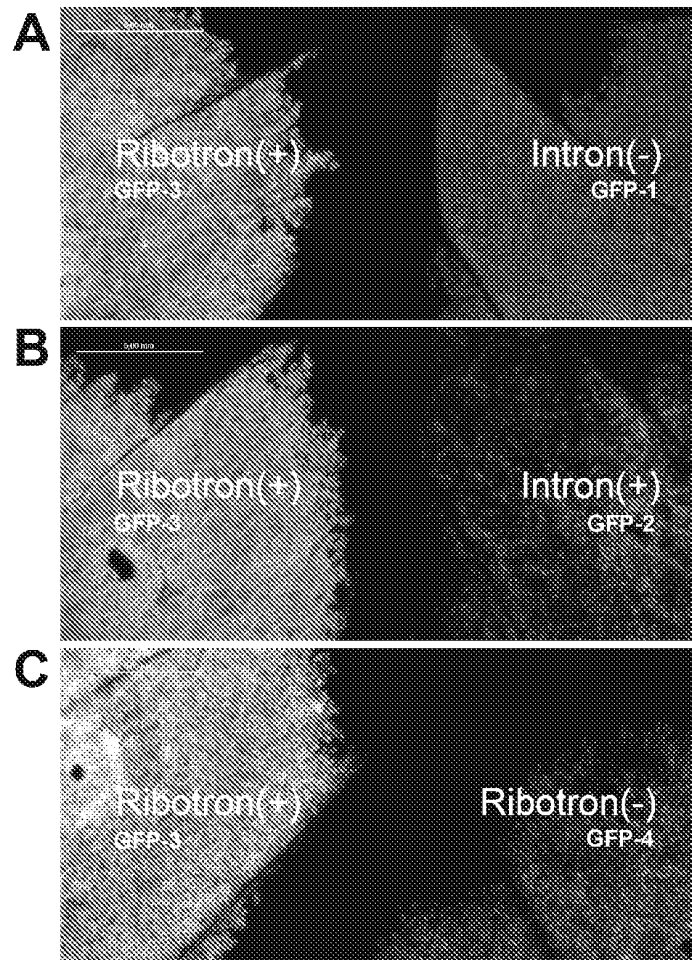


FIG. 4

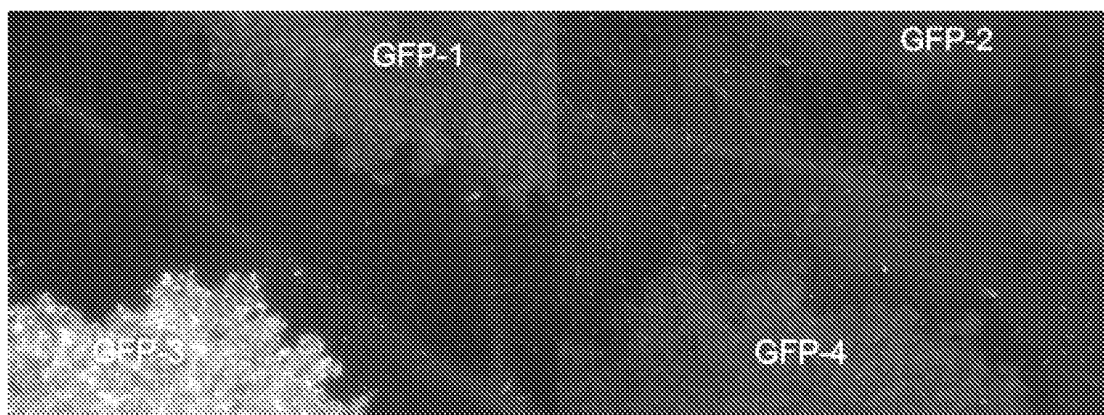


FIG. 5

ES 2 370 214 A1

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Consejo Superior de investigaciones Científicas (CSIC) (45%) Universidad Politécnica de Valencia (45%) Universidad de Valencia, Estudi General (10%)	
	<120> Incremento de la expresión de secuencias recombinantes en eucariotas	
10	<130> ES1641.719	
	<160> 8	
15	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 64	
20	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 1	
25	agccttacct gcagctgatg agctccaaaa agagcgaaac ctattaggctc ctgcagtact	60
	ggct	64
	<210> 2	
30	<211> 189	
	<212> DNA	
	<213> <i>Solanum tuberosum</i>	
35	<400> 2	
	gtttgtttct gcttctacct ttgatata tataataatt atcattaatt agtagtaata	60
40	taatatttca aatatttttt tcaaaataaa agaatgtagt atatagcaat tgcttttctg	120
	tagtttataa gtgtgtatat ttaatttat aacttttcta atatatgacc aaaacatggt	180
	gatgttttag	189
45	<210> 3	
	<211> 258	
	<212> DNA	
50	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Ribotron	
55	<400> 3	
	gtaagtttct gcttctacct ttgatata tataataatt atcattaatt agtagtaata	60
60	taatatttca aatatttttt tcaaaataaa agaaggatcc agccttacct gcagctgatg	120
	agctccaaaa agagcgaaac ctattaggctc ctgcagtact ggctgtagta tatagcaatt	180
	gcttttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata acttttctaa tatatgacca	240
65	aaatttgttg atgtgcag	258

ES 2 370 214 A1

<210> 4
 <211> 195
 <212> DNA
 5 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Intron ST-LS1 IV2 conteniendo el sitio de restricción GGATCC (BamHI)
 10
 <400> 4

 gtaagtttct gcttctacct ttgatataata tataataatt atcattaatt agtagtaata 60
 15 taatatttca aatatttttt tcaaaataaa agaaggatcc tgtagtatat agcaattgct 120
 tttctgtagt ttataagtgt gtatatttta atttataact tttctaatat atgaccaaaa 180
 20 tttgttgatg tgcag 195

 <210> 5
 <211> 940
 25 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 30 <223> Secuencia que codifica para GFP-1 que contiene el terminador PopIt

 <400> 5

 35 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 40 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accgacaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
 ctcgtgacca ccctgacctt cggcgtgcag tgcttcagcc gctacccccga ccacatgaag 240
 cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
 45 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgac gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 50 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcacatcagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
 55 tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatggtc 660
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggata actctcggca tggacgagct gtacaagtga 720
 gcgctcccta gacttgtcca tcttctggat tggccaactt aattaatgta tgaataaaaa 780
 60 ggatgcacac atagtgacat gctaactcact ataatgtggg catcaaagtt gtgtgttatg 840
 tgtaattact aattatctga ataagagaaa gagatcatcc atatttctta tcctaaatga 900
 65 atgtcacgtg tctttataat cttgatgaac cagatgcata 940

ES 2 370 214 A1

<210> 6
<211> 915
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Secuencia que codifica para GFP-1 que contiene el intrón SEQ ID NO: 4
10

<400> 6

15 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccacctggt cgagctggac 60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctgggtaagt 180
20 ttctgcttct acctttgata tatatataat aattatcatt aattagtagt aatataatat 240
ttcaaatatt tttttcaaaa taaaagaagg atcctgtagt atatagcaat tgcttttctg 300
tagtttataa gtgtgtatat ttaatttat aacttttcta atatatgacc aaaatttggt 360
25 gatgtgcagc ccaccctcgt gaccacctc ggctacggcc tgcagtgctt cgcccgtac 420
cccgaccaca tgaagcagca cgacttctc aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag 480
30 gagcgcacca tcttcttcaa ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagtcc 540
gagggcgaca ccctggtgaa ccgcatcgag ctgaaggga tgcacttcaa ggaggacggc 600
aacatcctgg ggcaacaagct ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc 660
35 gacaagcaga agaacggcat caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc 720
agcgtgcagc tcgccacca ctaccagcag aacaccccc tggcgacgg ccccgctgctg 780
40 ctgcccgaca accactacct gagctaccag tccgccctga gcaaagacct caacgagaag 840
cgcgatcaca tggctctgct ggagtctgtg accgccgccg ggatcactct cggcatggac 900
gagctgtaca agtga 915

45

<210> 7
<211> 978
50 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
55 <223> Secuencia que codifica para GFP-1 que contiene la secuencia SEQ ID NO: 3

60

65

ES 2 370 214 A1

<400> 7

	atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
5	ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
	ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctgggtaagt	180
10	ttctgcttct acctttgata tatatataat aattatcatt aattagtagt aatataatat	240
	ttcaaatatt tttttcaaaa taaaagaagg atccagcctt acctgcagct gatgagctcc	300
	aaaaagagcg aaacctatta ggtcctgcag tactggctgt agtatatagc aattgctttt	360
15	ctgtagttta taagtgtgta tattttaatt tataactttt ctaatatatg accaaaattt	420
	gttgatgtgc agcccaccct cgtgaccacc ttcggctacg gcctgcagtg cttcgcccgc	480
20	taccccgacc acatgaagca gcacgacttc ttcaagtccg ccatgcccga aggctacgtc	540
	caggagcgca ccatcttctt caaggacgac ggcaactaca agaccgcgc cgagggtgaag	600
	ttcgagggcg acaccctggt gaaccgcatc gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac	660
25	ggcaacatcc tggggcacia gctggagtac aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg	720
	gccgacaagc agaagaacgg catcaaggtg aacttcaaga tccgccacia catcgaggac	780
	ggcagcgtgc agctcgccga cactaccag cagaacaccc ccatcggcga cggccccgtg	840
30	ctgctgcccg acaaccacta cctgagctac cagtccgcc tgagcaaaga cccaacgag	900
	aagcgcgatc acatggtcct gctggagttc gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcatg	960
35	gacgagctgt acaagtga	978

<210> 8

<211> 977

40 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

45 <223> Secuencia que tiene deletada la Timina de la posición 290 de la secuencia SEQ ID NO: 7.

50

55

60

65

ES 2 370 214 A1

<400> 8

	atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
5	ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
	ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctgggtaagt	180
10	ttctgcttct acctttgata tatatataat aattatcatt aattagtagt aatataatat	240
	ttcaaatatt tttttcaaaa taaaagaagg atccagcctt acctgcagcg atgagctcca	300
	aaaagagcga aacctattag gtcctgcagt actggctgta gtatatagca attgcttttc	360
15	tgtagtttat aagtgtgtat attttaattt ataacttttc taatatatga ccaaatttg	420
	ttgatgtgca gcccaccctc gtgaccacct tcggctacgg cctgcagtgc ttcgcccgt	480
20	accccgacca catgaagcag cacgacttct tcaagtccgc catgcccgaaggctacgtcc	540
	aggagcgcac catcttcttc aaggacgacg gcaactacaa gaccgcgcc gaggtgaagt	600
	tcgagggcga caccctggtg aaccgcatcg agctgaaggg catcgacttc aaggaggacg	660
25	gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc tatatcatgg	720
	ccgacaagca gaagaacggc atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac atcgaggacg	780
30	gcagcgtgca gctcgccgac cactaccagc agaacacccc catcggcgac ggccccgtgc	840
	tgctgcccga caaccactac ctgagctacc agtccgcctt gagcaaagac cccaacgaga	900
	agcgcgatca catggtcctg ctggagtctg tgaccgccgc cgggatcact ctcggcatgg	960
35	acgagctgta caagtga	977

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030569

②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.04.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/82** (01.01.2006)
C12N15/113 (01.01.2010)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US2003014775 A1 (RIBOZYME PHARM INC) 16.01.2003	1-45
A	WO2008138896 A1 (EVGEN NV & OOSTHUYSE BERT WIM) 20.11.2008	1-45
A	US6127114 A (GENE SHEARS PTY) 03.10.2000	1-45

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
31.01.2011

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EBI-SITE, EMBASE, BIOSIS, NPL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.01.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-45	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-45	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US2003014775 A1 (RIBOZYME PHARM INC)	16.01.2003
D02	WO2008138896 A1 (EVGEN NV & OOSTHUYSE BERT WIM)	20.11.2008
D03	US6127114 A (GENE SHEARS PTY)	03.10.2000

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga una construcción génica diseñada para incrementar la expresión de una secuencia nucleotídica aislada, respecto a un control.

En concreto las reivindicaciones 28-33 hacen referencia a un polinucleótido de secuencia SEQ.ID.Nº 3 que a su vez comprende una secuencia de autocorte ribozimático tipo HHR, identificado como SEQ.ID.Nº 1, y una secuencia SEQ.ID.Nº.2 que corresponde al intrón nuclear no autocatalítico del gen ST-LS1. Se hace notar que la reivindicación 28 hace referencia a un número tan extremadamente elevado de posibles secuencias que cumplan con los requisitos establecidos (secuencia de autocorte insertada en cualquier posición de un intrón nuclear, donde la secuencia del intrón se caracteriza por comenzar en el extremo 5' con los nucleótidos GY, secuencia consenso YTNAN, extremo 3'AG, y donde ese polinucleótido está insertado en cualquier posición de una secuencia polinucleótida aislada) que hace imposible una búsqueda significativa sobre la totalidad de la materia reivindicada en la misma. Por tanto, tanto la búsqueda, como la opinión escrita, se han realizado en la medida que se refieren el objeto de la reivindicación 33.

Las reivindicaciones 34, 37, 38 se refieren a material biológico que contiene el polinucleótido anterior.

Las reivindicaciones 1-27, 39-41 hacen referencia al uso de la secuencia para el incremento de la expresión de una secuencia nucleotídica aislada, en una célula eucariótica, respecto de una célula control.

Las reivindicaciones 42-45 se refieren a un método para incrementar la expresión de una secuencia nucleotídica aislada, en una célula eucariótica, respecto a una célula control.

Todas las reivindicaciones que han sido objeto de búsqueda y examen, lo han sido en la medida que se refieren a las secuencias definidas como SEQ.ID.Nº 1, 2 y 3, que son las únicas que permiten llevar a cabo una búsqueda significativa del objeto de la presente solicitud.

D01 divulga una secuencia polinucleotídica con capacidad de corte, donde dicha molécula modula la expresión de un gen en plantas. Dichas secuencia comprende un RNA del tipo HHR (reivindicación 7, figura 1).

D02 describe una construcción polinucleotídica para incrementar la expresión de transgenes en plantas, animales y humanos, donde dicha secuencia consiste en una combinación de intrones y exones de menos de 60 nt.

D03 divulga ribozimas del tipo HHR con una elevada actividad endoribonucleasa (figuras 1A, 1B, 1C) y un método para inactivar moléculas de ARN diana mediante el uso de esas ribozimas.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica citados divulga una construcción similar a la reivindicada en la presente solicitud, ni se puede deducir de manera obvia su diseño tomando en consideración los documentos citados, solos o en combinación. Por tanto, la presente solicitud cumpliría con los requisitos de novedad y actividad inventiva.