



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 178 608**

② Número de solicitud: 200101133

⑤ Int. Cl.7: **C12N 15/12**
C12N 15/85
C12N 5/16
C12N 15/89
A01K 67/027

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **18.05.2001**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.2002**

Fecha de la concesión: **30.07.2004**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **16.09.2004**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.09.2004

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Montoliu José, Luis;
Giraldo Carbajo, Patricia y
Busturia Jimeno, Ana de**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Molécula de ADN con actividad aisladora de efectos de posición cromosomales en procesos de transferencia génica en células de animales.**

㉑ Resumen:

Molécula de ADN con actividad aisladora de efectos de posición cromosomales en procesos de transferencia génica en células de animales.

La molécula de ADN comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre (I) la secuencia de nucleótidos identificada como SEC. ID. N^o: 1, o un fragmento de la misma; y (II) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a), y tiene actividad aisladora de efectos de posición cromosomales en procesos de transferencia génica en células de animales. La molécula de ADN puede utilizarse para introducir transgenes y reducir la variabilidad de la expresión de transgenes en células de animales.

ES 2 178 608 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Molécula de ADN con actividad aisladora de efectos de posición cromosomales en procesos de transferencia génica en células de animales.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a moléculas de ADN con actividad aisladora de efectos de posición cromosomales en procesos de transferencia génica en células de animales y a su empleo para introducir transgenes y reducir la variabilidad de la expresión de transgenes en células de animales.

10 **Antecedentes de la invención**

La transferencia génica es una técnica compartida por muchas disciplinas científicas, como pueden ser la biología, la biomedicina y la biotecnología. Tanto para la generación de un animal modificado genéticamente con fines productivos, biomédicos o de biología básica, como para el desarrollo de vectores destinados a terapia génica se debe afrontar la movilización de secuencias génicas desde su localización original a una nueva de destino, la cual puede no ser permisiva para la expresión adecuada de la construcción génica experimental y/o terapéutica en cuestión.

20 En general, la práctica totalidad de los eventos de integración génica asociados a los procesos de transferencia (transgénesis, terapia génica, etc.) progresan estocásticamente. La deseada substitución génica, o integración específica mediante procesos de recombinación homóloga, es muy infrecuente y solamente puede ser abordada con cierta eficacia en células embrionales pluripotentes (ES) de ratón, a través de procesos de selección determinados. Lamentablemente esta metodología está limitada, en su aplicación, al ratón, la única especie para la cual se han podido aislar células embrionales pluripotentes ES capaces de colonizar todos los linajes celulares, incluyendo las células germinales, pudiendo así transmitir la modificación a la descendencia. Debido a ello, la generación de animales transgénicos en otras especies animales, distintas del ratón, y la aplicación de estrategias de transferencia génica en biotecnología y terapia génica en humanos, siguen dependiendo mayoritariamente de la integración al azar como evento inicial del proceso.

La impredecibilidad en la inserción de las secuencias experimentales y/o terapéuticas en el genoma del organismo receptor tiene dos consecuencias. En primer lugar un posible, pero inevitable, riesgo de mutación por inserción o interrupción de la pauta génica. Este primer riesgo no es muy elevado (en parte por la gran cantidad de secuencias no codificantes que hay en los genomas de mamíferos) y se ha evaluado, en el ratón, que puede representar hasta un 7% de los eventos de transferencia génica. En segundo lugar, proporcionalmente mucho más importante y responsable de la gran mayoría de fracasos y/o patrones de expresión inesperados en procesos de transferencia génica, existe el problema de los efectos de posición, asociado al lugar azaroso de inserción de la construcción experimental y/o terapéutica en el genoma del organismo receptor u hospedador. Si la construcción experimental y/o terapéutica se inserta en las cercanías de elementos reguladores de otros genes aquella puede verse afectada tanto negativa (en el caso de represores y/o *silencers*) como positivamente (en el caso de los *enhancers*, o activadores transcripcionales), resultando alterado su patrón de expresión y obteniéndose resultados distintos a los inicialmente planeados, con posible expresión ectópica (lugares de expresión no deseados) o en momentos diferentes a los previstos o a un nivel inferior o superior al originalmente proyectado.

En organismos eucariotas los genomas contienen un elevado porcentaje de secuencias intergénicas no codificantes. En animales, y más concretamente en mamíferos como el ratón o el hombre, estas secuencias intergénicas pueden corresponder hasta un 95% del genoma. El 5% restante contiene los exones (partes codificantes) de los genes y zonas adyacentes reguladoras. Los genes se encuentran situados de forma consecutiva, sin organización aparente alguna. En particular, es frecuente encontrar genes cuyo patrón de expresión es absolutamente dispar (por ejemplo un gen de expresión hepática al lado de uno específico de neuronas del cerebelo) situados uno inmediatamente al lado del otro. Desde hace tiempo se admite que la mejor definición de locus génico es la de dominio de expresión, que incluiría todas aquellas secuencias, codificantes y no codificantes, que permiten expresar aquel gen de forma óptima en tiempo, lugar y cantidades adecuadas. Los límites de los dominios de expresión corresponden a las secuencias frontera (*boundary elements*) o aisladoras (*insulators*) cuya función es limitar las interacciones e influencias provenientes de los dominios de expresión vecinos, para evitar que el patrón de expresión génica específico se vea afectado. Aunque la existencia de estos elementos aisladores se presupone para la mayoría (o quizás totalidad) de los dominios de expresión existen muy pocas secuencias con estas características que hayan podido ser descubiertas y evaluadas experimentalmente.

La existencia de secuencias de ADN aisladoras, frontera de los dominios de expresión, y su importancia en la delimitación estructural y funcional de los dominios de expresión así como su papel como secuencias bloqueadoras de efectos no deseados provenientes de fuera del propio dominio de expresión, fue descrita inicialmente en moscas (*Drosophila melanogaster*) a través de los elementos *scs* y *scs'* que flaquean al par de genes *hsp70* (Kellum R & Schedl P. 1991. A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell* 64:941-50; Kellum R & Schedl P. 1992. A group of *scs* elements function as domain boundaries in an enhancer-blocking assay. *Mol Cell Biol.* 12(5):2424-31; Vazquez J & Schedl P. 1994. Sequences required for enhancer blocking activity of *scs* are located within two nuclease-hypersensitive regions. *EMBO J.* 13(24):5984-93; Geyer PK. 1997. The role of insulator elements in defining domains of gene expression. *Curr Opin Genet Dev.* 7 (2):242-8) quienes descubrieron una de las características más sorprendentes y esenciales de estos elementos: su capacidad de bloquear la acción de activadores transcripcionales (*enhancer*) cuando se situaban entre estos y el promotor del gen. Posteriormente se han descrito otros elementos *insulator* en *D. melanogaster* como el del *Su(Hw)* (Geyer PK & Corces VG. 1992. DNA position-specific repression of transcription by a *Drosophila* zinc finger protein. *Genes Dev.* 6 (10):1865-73; Roseman RR et al. 1993. The *su (Hw)* protein insulates expression of the *Drosophila melanogaster white* gene from chromosomal position-effects. *EMBO J.* 12(2):435 -42), otros invertebrados, como el elemento descrito en el gen de la arilsulfatasa (Akasaka K et al. 1999. Upstream element of the sea urchin arylsulfatase gene serves as an insulator. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 45(5):555-65) y el cluster de las histonas tempranas (Melfi R et al. 2000. Functional characterization of the enhancer blocking element of the sea urchin early histone gene cluster reveals insulator properties and three essential cis-acting sequences. *J. Mol. Biol.* 304:753 -763) de erizo de mar y en vertebrados, como el *insulator* del locus de las β -globinas de pollo (Chung JH et al. 1993. A 5' element of the chicken β -globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* 74:505-14; Chung JH et al. 1997. Characterization of the chicken beta-globin insulator. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94 (2):575-80; Recillas-Targa F et al. 1999. Positional enhancer-blocking activity of the chicken beta-globin insulator in transiently transfected cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(25):14354-9; Bell AC et al. 1999. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell.* 98(3):387-96). No obstante, ninguna de dichas secuencias aisladoras proporciona resultados totalmente satisfactorios. En particular, el empleo de secuencias de ADN aisladoras de pollo (Chung et al., patente norteamericana US 5.610.053) presenta diversos problemas, entre los que se encuentran (i) la generación poco reproducible de animales transgénicos con expresión independiente de los efectos de posición ya que aunque existen ejemplos que demuestran que ha funcionado bien (Taboit-Dameron et al. 1999. Association of the 5'HS4 sequence of the chicken β -globin locus control region with human EF1 α promoter induces ubiquitous and high expression of human CD55 and CD59 cDNAs in transgenic rabbits. *Transgenic Research* 8:223-35) existen otros ejemplos que demuestran que no ha funcionado todo lo bien que cabría esperar (Potts W et al. 2000. Chicken β -globin 5'HS4 insulators function to reduce variability in transgenic founder mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273:1015-8), y (ii) la necesidad de multiplicar la presencia de la secuencia aisladora a ambos lados de la construcción génica que se quiere proteger de los efectos de posición cromosomales, lo que puede generar problemas de clonaje, estabilidad y posteriormente inducir la inactivación en el genoma del hospedador por repetición de secuencias en tándem en una misma localización.

Por otra parte, no todos los lugares del genoma son igualmente permisivos para la expresión de la construcción experimental y/o terapéutica. Existen zonas eucromáticas, de cromatina expuesta, poco condensada y accesible a los factores proteicos nucleares, que si es permisible a la expresión. Otros, denominados heterocromáticos, con cromatina muy condensada, inaccesible a los factores proteicos nucleares, no permiten la expresión génica. La presencia de elementos frontera o aisladores en la construcción experimental y/o terapéutica permite reconvertir un posible lugar heterocromático (no compatible con la expresión génica) en eucromático (permisivo para la expresión génica).

A pesar de las considerables ventajas que supone poder controlar los efectos de posición cromosomales en procesos de transferencia génica en células de animales, se dispone tan solo de un número muy reducido de secuencias de ADN con actividad aisladora, las cuales, además, no proporcionan, en general, resultados totalmente satisfactorios, por lo que sigue existiendo la necesidad de buscar nuevas secuencias de ADN aisladoras con el fin de incrementar el número de medios para controlar los efectos de posición y garantizar un nivel de expresión óptimo de la construcción experimental y/o terapéutica.

Compendio de la invención

La invención se enfrenta con el problema asociado con los efectos de posición que afectan a cualquier proceso de transferencia génica y supone, en gran medida, la no expresión o expresión inadecuada de las construcciones génicas experimentales y/o terapéuticas, reduciendo de este modo, en un grado variable,

el éxito de dichas construcciones génicas.

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han identificado unas moléculas de ADN con actividad aisladora de efectos de posición cromosomales en procesos de transferencia génica en células de animales. La actividad aisladora de dichas moléculas de ADN se ha puesto de manifiesto en experimentos de protección frente a efectos de posición realizados en moscas transgénicas y en ratones transgénicos.

Una molécula de ADN como la proporcionada por esta invención, con actividad aisladora, permite controlar los efectos de posición limitando su efecto, para garantizar un nivel de expresión óptimo de la construcción experimental y/o terapéutica, en tiempo, lugar y cantidad, independientemente del lugar donde la construcción experimental y/o terapéutica resulte insertada en el genoma.

Por tanto, un objeto de esta invención lo constituyen dichas moléculas de ADN.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye una construcción de ADN que comprende, al menos, una de dichas moléculas de ADN y un gen de interés.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un vector que comprende, al menos, una de dichas moléculas o construcciones de ADN.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de dichas moléculas o construcciones de ADN o de dichos vectores, para producir células de animales recombinantes, o para introducir transgenes en células de animales y/o para reducir la variabilidad de la expresión de transgenes en células de animales. Las células de animales y animales transgénicos (excluyendo los seres humanos) resultantes también constituyen objetos adicionales de esta invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una representación esquemática de las moléculas de ADN denominadas LCR, LCRmut, HS y X indicando su posición relativa en la zona 5' reguladora de la expresión génica del gen de la tirosinasa de ratón.

La Figura 2 es una representación esquemática de los cromosomas artificiales de levadura (YACs) identificados como YRT2, YRT3, YRT4 e YRT5 utilizados para identificar y comprobar la actividad controladora del locus de una molécula de ADN de ratón obtenida a partir de la secuencia LCR (*Locus Control Region*) del gen de la tirosinasa de ratón (véase el Ejemplo 1).

La Figura 3 es una representación esquemática de un fragmento del cromosoma 7 de ratón, que contiene el gen de la tirosinasa y su región controladora de locus (LCR), así como un fragmento ampliado de dicha LCR y de la región del mismo gen de la tirosinasa que contiene el tercer exon y las secuencias intrónicas circundantes (TE3). La Figura 3 también incluye un esquema de las construcciones génicas utilizadas en un experimento de protección de efectos de posición en moscas transgénicas (véase el Ejemplo 2).

La Figura 4 es una representación esquemática de un fragmento del cromosoma 7 de ratón, que contiene el gen de la tirosinasa y una región controladora de locus (LCR), así como un fragmento ampliado de dicha LCR que muestra la caja AB y el fragmento HS. Los fragmentos LCR y HS mostrados en esta Figura 4 son idénticos a los que aparecen en la Figura 1. La Figura 4 también incluye las construcciones génicas utilizadas en un experimento de protección de efectos de posición en ratones transgénicos (véase el Ejemplo 3).

La Figura 5 comprende 3 diagramas de barras que muestran la actividad del transgén indicador luciferasa (media de seis individuos +/- desviación standard) obtenida en nueve tejidos de diferentes líneas de ratones transgénicos obtenidas mediante el empleo de las construcciones génicas denominadas pTLuc (Figura 5A), pHSTLuc (Figura 5B) y pLCRTLuc (Figura 5C), mostradas en la Figura 4. Las abreviaturas utilizadas se indican en la parte correspondiente a Materiales y Métodos del Ejemplo 3.

La Figura 6 muestra un conjunto de líneas independientes de moscas *Drosophila melanogaster* transgénicas obtenidas mediante el empleo de la molécula de ADN con actividad aisladora proporcionada por esta invención, utilizando las construcciones descritas en la Figura 3 [véase el Ejemplo 2]. Cada barra horizontal representa una línea independiente. Los datos mostrados corresponden a los análisis del

color de los ojos de las moscas transgénicas en individuos heterocigotos, esto es, portadores de una copia de la construcción. Dentro de cada barra se representa gráficamente el porcentaje de moscas de cada una de las cinco categorías de color de ojos consideradas [red (=wild-type o salvaje), brown, orange, pale orange y yellow].

5 La Figura 7 muestra el mismo conjunto de líneas independientes de moscas *Drosophila melanogaster* transgénicas mostradas en la Figura 6 y obtenidas mediante el empleo de la molécula de ADN con actividad aisladora proporcionada por esta invención, utilizando las construcciones descritas en la Figura 3 [véase el Ejemplo 2]. En este caso, los datos mostrados corresponden a los análisis del color de los ojos de
10 las moscas transgénicas en individuos homocigotos, esto es, portadores de dos copias de la construcción, una en cada cromosoma homólogo. Cada barra horizontal representa una línea independiente. Dentro de cada barra se representa gráficamente el porcentaje de moscas de cada una de las cinco categorías de color de ojos consideradas [red (=wild-type o salvaje), brown, orange, pale orange y yellow].

15 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una molécula de ADN, en adelante molécula de ADN de la invención, que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- 20 a) la secuencia de nucleótidos identificada como SEC. ID. N°: 1, o un fragmento de la misma; y
b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir a cualquier secuencia de ADN que puede ser aislada o construida en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la
25 SEC. ID. N°: 1, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia.

30 En general, una molécula de ADN análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos identificada como la SEC. ID. N°: 1. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 70 %, preferentemente de, al menos un 85 %, o más preferentemente
35 de, al menos, un 95 %.

La molécula de ADN de la invención puede proceder de un organismo en el que se encuentre de forma natural o bien de un organismo hospedador transformado con dicha molécula de ADN. La molécula de ADN de la invención puede ser aislada, mediante técnicas convencionales, a partir del ADN de cualquier organismo que la contenga mediante el empleo de sondas o de oligonucleótidos preparados a partir de
40 la información sobre la secuencia de nucleótidos de dicha molécula de ADN proporcionada en esta descripción.

La molécula de ADN de la invención presenta actividad aisladora de efectos de posición cromosomales en procesos de transferencia génica en células de animales. La actividad aisladora de la molécula de ADN
45 de la invención se puede ensayar mediante los experimentos de protección frente a efectos de posición realizados en moscas y ratones transgénicos que se describen en los Ejemplos 2 y 3. La molécula de ADN de la invención incluye los fragmentos de la misma que presentan dicha actividad aisladora.

En una realización particular, la molécula de ADN de la invención es una molécula de ADN de ratón obtenida a partir de la secuencia LCR (*Locus Control Region*) del gen de la tirosinasa de ratón, en concreto, corresponde al fragmento de restricción *EcoRI-EcoRI* de la región reguladora 5' del gen de la
50 tirosinasa (código *mouse genome informatics* (MGI) 98880, The Jackson Laboratory, USA), situado aproximadamente a doce mil kilobases (-12 kb) del inicio de transcripción del gen de la tirosinasa, localizado en la zona distal del cromosoma 7 murino, en la posición 44 cM del mapa genético de dicho cromosoma.
55 Dicha molécula de ADN tiene una longitud de 3.711 pares de bases (pb) y su secuencia de nucleótidos corresponde a la SEC. ID. N°: 1. De dicha molécula de ADN se conocían 1.133 pb correspondientes a su región 3' terminal (*GenBank* X76647) (Ganss R et al. 1994 *EMBO J.* 13: 3083-93).

La actividad aisladora de dicha molécula de ADN ha podido ser determinada experimentalmente tanto
60 en la secuencia completa de 3.711 pb denominada LCR (SEC. ID. N°: 1) como en distintos fragmentos más pequeños incluidos y/o derivados de ella denominados (véase la Figura 1):

ES 2 178 608 B1

LCRmut: idéntica a LCR excepto por una delección de 59 pb que elimina la caja AB entre las posiciones 2.622 y 2.683, inclusive de la SEC. ID. N°: 1 (3.652 pb);

5 HS: constituida por la secuencia de nucleótidos contenida entre el nucleótido 1.583 y el 3.711 de la SEC. ID. N°: 1 (2.128 pb); y

X: constituida por la secuencia de nucleótidos contenida entre el nucleótido 222 y el 2.617 de la SEC. ID. N°: 1 (2.395 pb).

10 Las moléculas de ADN LCR (SEC. ID. N°: 1), LCRmut, HS y X han demostrado poseer actividad aisladora en experimentos de protección frente a efectos de posición realizados en moscas (*D. melanogaster*) transgénicas [véase el Ejemplo 2]. Además, las moléculas de ADN LCR (SEC. ID. N°: 1) y HS han demostrado igualmente poseer actividad aisladora en experimentos de protección frente a efectos de posición realizados en ratones transgénicos [véase el Ejemplo 3].

15 La molécula de ADN de 3.711 pb denominada LCR (SEC. ID. N°: 1) fue identificada inicialmente como un fragmento *EcoRI-EcoRI* que contenía una hipersensibilidad a la enzima DNasaI, específica de células de melanoma de ratón, que expresan el gen de la tirosinasa (Ganss et al. 1994. EMBO J. 13:3083-93). Las hipersensibilidades (HS) al corte por el enzima DNasaI se asocian habitualmente a la presencia de secuencias específicas de ADN de unión a proteínas nucleares reguladoras de la expresión génica, tales como los factores de transcripción. La búsqueda de nuevas regiones reguladoras del gen, como la molécula de ADN denominada LCR, situada a doce mil pares de bases del inicio de transcripción del gen de la tirosinasa, se inició para intentar comprender el comportamiento distinto de transgenes con el gen de la tirosinasa de ratón basados en minigenes (Beermann et al. 1990. EMBO J. 9:2819-2826) o cromosomas artificiales de levadura (Schedl et al. 1993. Nature 362:258-261). Los primeros limitan la presencia de regiones reguladoras 5' del gen de la tirosinasa a unas 5 kb, y solamente contienen el primer intrón. Los segundos, contienen hasta 150 kb de regiones potencialmente reguladoras 5' y la totalidad de los intrones que espacian los cinco exones del gen de la tirosinasa de ratón.

30 El uso de minigenes con el gen de la tirosinasa resultó en ratones transgénicos con un nivel de pigmentación variable e inferior al de animales salvajes (Beermann et al. 1990. EMBO J. 9:2819-2826). Por el contrario, el uso de cromosomas artificiales de levadura garantizó una pigmentación indistinguible de los animales salvajes en todas las líneas independientes de ratones transgénicos analizadas (Schedl et al. 1993. Nature 362:258-261). La evidente diferencia en la capacidad de expresión de ambos tipos de construcciones génicas sugería la existencia de nuevas secuencias de ADN reguladoras de la expresión génica, presentes en los cromosomas artificiales de levadura y ausentes en los minigenes, responsables del correcto funcionamiento del transgén en ratones transgénicos.

40 La primera indicación de la existencia de una posible región reguladora situada más allá de las 5 kb analizadas en los minigenes de tirosinasa provino de la caracterización del alelo *chinchilla-mottled* del gen de la tirosinasa, cuyo fenotipo asociado es una pigmentación variegada. Los investigadores detectaron la pérdida de una hipersensibilidad (HS) a la DNasaI a unas 15 kb del inicio de transcripción del gen y postularon esta ausencia como la base molecular del alelo mutante mencionado (Porter et al. 1991 Dev. Genetics 12: 393-402). Posteriormente se pudo comprobar que esta región HS se incluía dentro del fragmento *EcoRI-EcoRI*, denominado LCR a lo largo de este documento y representado por la SEC. ID. N°: 1. Posteriormente se comprobó que la delección de la región HS en cromosomas artificiales de levadura conllevaba la pérdida de la pigmentación salvaje y suponía la aparición de una pigmentación mucho más débil y variegada (Montoliu et al. 1996 EMBO J. 15: 6026-6034) [Véase la Figura 2 y el Ejemplo 1]. Estos resultados permitieron identificar a la molécula de ADN de 3.711 pb (SEC. ID. N°: 1) como una región controladora de locus (LCR) del gen de la tirosinasa de ratón, de forma análoga a como se han definido otras LCRs identificadas funcionalmente en animales transgénicos (Li et al. 1999 Trends Genet. 15: 403-408).

55 En esta molécula de ADN de 3.711 pb coexisten una función activadora (*enhacer*) de la transcripción génica (cuya actividad depende de la presencia de la caja AB, véase la Figura 1) (Ganss et al. 1994 EMBO J. 13: 3083-93) y una función aisladora de los efectos de posición, descrita en el presente documento, independiente de la presencia de la caja AB (véanse las Figuras 1 y 3 y el Ejemplo 2; compárese la actividad aisladora obtenida con la molécula LCR o LCRmut).

60 Aunque no se desea estar vinculado por ninguna hipótesis, el análisis de la actividad aisladora de las secuencias ensayadas (LCR, LCRmut, HS y X) sugiere la presencia de un fragmento común a todas ellas de 1.034 pb, delimitado por los enzimas *XbaI* (en posición 1.583) y *StyI* (en posición 2.617), que podría

ser el responsable de dicha actividad aisladora.

La invención proporciona, además, una construcción de ADN, en adelante, construcción de ADN de la invención, que comprende la molécula de ADN de la invención. La construcción de la invención puede ser
5 utilizada en el aislamiento y protección de genes así como en la producción de proteínas o productos de interés codificados por el gen o los genes utilizados en dichas construcciones. La presencia de, al menos, una molécula de ADN de la invención en la construcción de ADN de la invención permite controlar los efectos de posición limitando su efecto, y garantizar un nivel de expresión óptimo de dicha construcción génica en tiempo, lugar y cantidad, independientemente del lugar donde la construcción génica resulte
10 insertada en el genoma del organismo animal hospedador o receptor utilizado.

En general, la construcción de ADN de la invención comprende, al menos, una secuencia de ADN de la invención y una unidad de transcripción que comprende, al menos, un gen de interés, tal como un gen que codifica una proteína o un precursor de la misma, o un producto de interés, y un promotor que dirige
15 la transcripción del gen de interés, al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción del gen de interés y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc.

La construcción de ADN de la invención puede contener una o más moléculas de ADN de la invención. En una realización particular, la construcción de ADN de la invención contiene, al menos, 2 moléculas de ADN de la invención en forma de tándem con orientaciones directas y/o invertidas puesto que la función de las mismas es independiente de la orientación con respecto a la unidad de transcripción. Las moléculas de ADN de la invención se sitúan de forma tal que el gen de interés permanece aislado del ADN que
25 rodea al sitio de integración. Ventajosamente, las moléculas de ADN de la invención se sitúan a ambos lados del gen de interés, es decir, en posiciones 5' y 3' respecto a la unidad de transcripción con el fin de aislar el gen de interés y protegerle de los efectos de las secuencias de ADN que actúan en cis de la cromatina.

En una realización particularmente adecuada para aislar la expresión del gen de interés, una primera molécula de ADN de la invención se sitúa en posición 5' (*upstream*) de la unidad de transcripción y una segunda molécula de ADN de la invención, que puede ser igual o diferente a la primera y puede tener la misma orientación o la contraria, se sitúa en posición 3' (*downstream*) del gen de interés. En caso de que la construcción de ADN de la invención contuviera más de un gen de interés, las unidades de
35 transcripción de dichos genes podrían estar separadas por moléculas de ADN de la invención.

Por gen de interés se entiende cualquier unidad de transcripción que codifique para una proteína cuya actividad sea biológica, terapéutica o biotecnológicamente interesante y relevante para la sociedad. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de genes de interés son los factores de coagulación sanguínea VIII y IX,
40 cuya carencia es causa de las enfermedades congénitas Hemofilia de Tipo A ó B, respectivamente; el gen que codifica para la proteína CFTR, cuya carencia es causa de la fibrosis quística, la enfermedad congénita de herencia autosómica más común; el gen que codifica para la hormona del crecimiento, necesaria en pacientes afectados por diferentes tipos de enanismo; etc. Genes de interés son igualmente aquellos que se pretenden expresar bajo el control de secuencias de ADN de expresión específicas en glándula mamaria,
45 con el objeto de poder producir y purificar proteína recombinante en la leche de animales transgénicos. Secuencias de ADN de expresión específica en glándula mamaria existen y se conocen (gen de la proteína acida del suero de la leche [WAP], gen de la α -lactoglobulina, gen de la α -lactalbúmina, genes de las caseínas) aunque todos ellos, en mayor o menor medida, están expuestos a los efectos de posición en experimentos de transferencia génica y podrían beneficiarse de la adición de secuencias aisladoras como
50 la descrita en este documento. Igualmente genes de interés son cualquier unidad de transcripción cuya función desee estudiarse a lo largo del desarrollo y, en general, en cualquier situación experimental que conlleve algún proceso de transferencia génica y cuyo objetivo sea el estudio biológico del gen en cuestión.

Las construcciones de ADN de la invención pueden ser utilizadas, en general, en cualquier proceso de transferencia génica, por ejemplo, en la generación de animales transgénicos con fines biológicos, biomédicos y/o biotecnológicos, en la generación de vectores de expresión para terapia génica basados en elementos virales y no virales que requieran la inserción de ADN terapéutico en el genoma del organismo hospedador, y, en general, en cualquier aplicación que requiera transferencia génica y cuyo nivel y patrón de expresión desee garantizarse de forma óptima, independientemente del sitio de inserción en el genoma
60 del organismo hospedador. La molécula de ADN de la invención también puede ser utilizada para aislar genes concretos introducidos y expresados posteriormente en animales transgénicos, tales como moscas, ratones, etc. Las construcciones de ADN de la invención pueden ser introducidas en células fetales o en

embriones para producir animales transgénicos que contienen la molécula de ADN de la invención y el gen de interés deseado. Mediante el aislamiento del gen de interés introducido en el animal transgénico, la expresión de dicho gen queda protegida frente a una expresión negativa o inapropiadamente positiva del mismo.

5 Las construcciones de ADN de la invención pueden ser insertadas en vectores apropiados, tales como plásmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos o virus, que pueden contener, además, un origen bacteriano o de levadura de replicación para que pueda ser amplificado en bacterias
10 o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferente al gen o genes de interés. Por tanto, la invención también se refiere a un vector que comprende una construcción de ADN de la invención. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de
15 dicha célula y se replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en el que (o en los que) se ha integrado o un virus, por ejemplo, un retrovirus útil en terapia génica.

El vector de la invención puede ser obtenido por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia (Kovesdi et al. 1997. *Curr Opin Biotech* 8:583-589; Giraldo y Montoliu, 2001. *Transgenic Res.* 10:83-103; Coffin et al. 1998. *Retroviruses*, CSHLP; Robbins et al. 1998. *Trends Biotech.* 16:35-40; Anderson. 1998. *Nature* 392:25-30; Schindelbauer. 1999. *BioEssays* 21:76-83).

La invención también proporciona una célula de animal que comprende una molécula de ADN de la invención, o una construcción de ADN de la invención o el vector mencionado más arriba. Las células
25 hospedadoras que se pueden transformar con la construcción de ADN de la invención o con dicho vector pueden ser, por ejemplo, células eucarióticas, tales como células de tejidos animales y líneas celulares animales (Douglas et al. 1996. *Nature Biotech* 14:1574-1578; Guidotti et al. 1998. *Hum Mol Gen* 7:831-838; Huxley. 1997. *Trends Genet* 13:345-347; Rols et al. 1998. *Nature Biotech* 16:168-171). La transformación de células de animales puede realizarse por métodos convencionales (Ausubel et al. eds. 1990. *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience).

La invención también proporciona un animal transgénico que comprende, al menos, una célula de animal transgénica que contiene, al menos, una molécula de ADN de la invención, o una construcción de ADN de la invención o el vector mencionado más arriba. El término "animal transgénico" no incluye a los
35 seres humanos, aunque las células humanas, en particular, las no germinales, si pueden ser transformadas con la molécula de ADN, la construcción o el vector proporcionado por esta invención en cualquiera de las variantes de la denominada terapia génica somática.

La invención proporciona, además, un kit que comprende, al menos, una molécula de ADN de la invención o una construcción de ADN de la invención o un vector proporcionado por esta invención. En una realización particular, dicha molécula de ADN de la invención puede estar contenida en un vector o plásmido que contiene, o que puede ser fácilmente adaptado por el usuario, los elementos de ADN apropiados para la expresión adecuada del gen o genes de interés. A modo ilustrativo, el vector o plásmido puede contener, al menos, una molécula de ADN de la invención y, al menos, un sitio de inserción del
45 gen de interés o de su unidad de transcripción, definido por una región de reconocimiento de una enzima de restricción. El plásmido o vector contenido en dichos kits puede estar en el seno de un medio de estabilización y conservación del tipo habitualmente utilizado en la conservación y almacenamiento de este tipo de productos, o bien, puede ser liofilizado y reconstituido cuando se vaya a utilizar mediante la adición del medio apropiado.

50 Adicionalmente, la invención proporciona un método para producir células de animales recombinantes, o para introducir transgenes en células de animales, o para reducir la variabilidad de la expresión de transgenes en células de animales, que comprende el empleo de una construcción de ADN de la invención, en particular, que comprende transformar células de animales con dicha construcción de ADN de la invención bajo condiciones en las que dichas células pueden ser transformadas.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1

60 *Obtención y caracterización de moléculas de ADN de origen murino con actividad LCR*

A partir de la secuencia LCR (*Locus Control Region*) del gen de la tirosinasa de ratón se ha obtenido una molécula de ADN con actividad aisladora. Como es conocido, la tirosinasa es el enzima clave en la biosíntesis de la melanina. La ausencia o síntesis defectuosa de este enzima es la causa más frecuente del albinismo, patología que se ha descrito en mamíferos y en la mayoría de vertebrados. El gen está regulado durante el desarrollo y posee un patrón de expresión muy específico expresándose solamente en dos tipos celulares no emparentados ontogenéticamente: los melanocitos presentes en piel, folículos capilares, iris y coroides, y en el epitelio pigmentado de la retina. Los primeros provienen de la migración y posterior diferenciación de las células de la cresta neural mientras que el epitelio pigmentado de la retina proviene del esbozo ocular o copa óptica.

El gen de la tirosinasa de ratón corresponde al locus *c* (“albino”) y está situado en el cromosoma 7 murino. El gen de la tirosinasa en el ratón se compone de cinco exones que ocupan un centenar de kilobases (kb) del genoma. Diversos grupos de investigación, y de forma simultánea, describieron que la base molecular del albinismo en el ratón era una mutación puntual que modificaba un aminoácido de la proteína transformándola en un producto inactivo. La identidad de la tirosinasa con el locus *c*, albino, fue finalmente confirmada al obtenerse ratones pigmentados transgénicos portadores de copias funcionales del gen de la tirosinasa, capaces de corregir la condición albina de los embriones microinyectados. No obstante, el nivel de pigmentación obtenido con estos minigenes era muy variable y en ningún caso comparable al de la cepa salvaje, sugiriendo la existencia de efectos de posición como la causa más probable de la expresión deficiente de los transgenes (Beermann et al. 1990. *EMBO J.* 9:2819-2826). La utilización de transgenes de tirosinasa basados en YACs permitió restituir la expresión normal del gen obteniéndose la corrección completa del fenotipo albino (Schedl A et al. 1993. A yeast artificial chromosome covering the tyrosinase gene confers copy number-dependent expression in transgenic mice. *Nature* 362:258-261; Jeffery G et al. 1994. Correction of abnormal retinal pathways found with albinism by introduction of a functional tyrosinase gene in transgenic mice. *Dev. Biol.* 16:460-464; Jeffery G. et al. 1997. Correction of retinal abnormalities found in albinism by introduction of a functional tyrosinase gene in transgenic mice and rabbits. *Brain Res Dev Brain Res.* 99:95-102). Por todo ello, el sistema del gen de la tirosinasa y la corrección del albinismo consituye un modelo experimental excelente para el estudio de los mecanismos implicados en el proceso de transferencia génica, dado que se dispone de un dominio de expresión autónomo (250 kb dentro de un YAC) capaz de organizar la cromatina de forma adecuada independientemente del sitio de inserción en el genoma receptor.

En el caso del gen de la tirosinasa la comparación entre transgenes basados en minigenes o en YACs indicaba que estos últimos contenían la totalidad de los elementos reguladores de la expresión del gen, elementos ausentes en las construcciones originales. Los transgenes basados en YACs eran capaces de reconstituir el patrón de expresión original del gen endógeno donde fuera que se integraran. Todo ello indicaba que algún elemento de los indicados anteriormente, que no estaba incluido en los minigenes, debía existir adicionalmente en el YAC.

El YAC utilizado en los ensayos realizados por los inventores tenía alrededor de 155 kb de promotor y regiones 5' colindantes donde podían existir el elemento o elementos. Una indicación para encontrar este elemento partió de un trabajo que describía la base molecular de un alelo del locus *c* (*chinchilla-mottled*) caracterizado por una coloración a rayas de los ratones portadores. Se describió una posible inversión o inserción de secuencias que trasladaba un sitio hipersensible a la DNasaI (HS) de su lugar habitual (a unas 12 kilobases dirección 5' del promotor) a decenas de kilobases del promotor (Porter S. et al. 1991. Mosaicism of tyrosinase-locus transcription & chromatin structure in dark vs. Light melanocyte clones of homozygous chinchilla-mottled mice. *Dev. Genet.*, 12, 393-402). Dicha secuencia resultó contener un HS específico de células de melanoma (células que expresan la tirosinasa). Además, un análisis mediante transfecciones celulares detectó que este HS se comportaba como un potente activador transcripcional (*enhancer*) y, mediante delecciones, se acotó la actividad a una secuencia de unos 200 pb que parecía unir proteínas nucleares (*in vitro*) (Ganss et al. 1994. A cell-specific enhancer far upstream of the mouse tyrosinase gene confers high level and copy number-related expression in transgenic mice. *Embo J* 13:3083-93). En ese mismo trabajo se comprobó que la adición de esa secuencia HS a uno de los minigenes de tirosinasa de ratón anteriormente utilizados mejoraba su comportamiento en animales transgénicos confiriéndole un nivel de expresión relativo al número de copias integradas en el genoma del ratón transgénico (Montoliu. 1994. *Current Biol* 4:1025).

No obstante, el resultado definitivo que permitió asociar esta secuencia HS con una región controladora de locus (LCR) se obtuvo combinando la nueva tecnología de ratones transgénicos con YACs y las infinitas posibilidades de modificación que ofrece el sistema de levaduras. Así pues, se construyeron tres nuevos YACs a partir del original de 250 kb, denominado YRT2. En primer lugar (y usando siempre técnicas de recombinación homóloga en levadura) se deleccionaron todas las secuencias situadas más allá

de la recientemente identificada HS, situada unas 12 kb más arriba del promotor. Se generó así un YAC de menor tamaño (unas 100 kb) al que se le denominó YRT3. En segundo lugar se preparó una nueva delección que incluía la secuencia HS, con lo cual desaparecía ésta del YAC, generándose un nuevo YAC al que se le denominó YRT4. Finalmente, se substituyó la secuencia HS por un gen marcador de levadura obteniéndose el YAC denominado YRT5, idéntico al original YRT2 pero sin la secuencia HS. La Figura 2 muestra esquemáticamente los transgenes (YRT2, YRT3, YRT4 e YRT5).

Los transgenes YRT3, YRT4 e YRT5 fueron microinyectados a embriones de ratón albinos y se analizó los ratones transgénicos obtenidos. El resultado no dejaba lugar a dudas. Los ratones con el transgén YRT3, que mantenía la secuencia HS aun perdiendo todas las secuencias situadas más allá del extremo 5' de la secuencia HS, eran pigmentados como los ratones salvajes o como los ratones con el transgén original YRT2. Sin embargo, tanto una delección como la substitución de la secuencia HS suponía una pérdida muy importante del nivel de pigmentación conseguido. Los ratones transgénicos con YRT4 e YRT5 manifestaban un nivel de expresión variable (variegada) y mucho más débil. Frecuentemente la pigmentación solo era aparente en los ojos aunque posteriormente se ha demostrado la expresión variegada de los transgenes de tirosinasa YRT4 en todos los tipos celulares capaces de expresar el gen (Giménez et al. 2001. Variegated expression and delayed retinal pigmentation during development in transgenic mice with a deletion in the locus control region of the tyrosinase gene. *Genesis* 30(1): 21-25). Estos resultados tan contrastados han permitido deducir la importancia de esta secuencia HS al comportarse como una LCR ya que ninguna otra secuencia del entorno fue capaz de compensar en su ausencia ni necesitó de otras para comandar eficientemente la transcripción del gen (Montoliu L, et al. 1996. A locus control region at -12 kb of the tyrosinase gene. *EMBO J* 15:6026-6034).

Ejemplo 2

Generación de moscas transgénicas con capacidad de garantizar la protección de una construcción génica experimental frente a los efectos de posición cromosomales en el genoma de la mosca

Materiales y métodos

Construcciones utilizadas en moscas transgénicas (véase la Figura 3)

w (pCaSpeR3): descrito en Pirrota, V. 1993, en R. L. Rodrigues and D. T. Denhardt (eds) *Vectors: A Survey of Molecular Cloning. Vectors and Their Uses*, pp 437-456. Es el plásmido control, de referencia, origen de todas las demás construcciones génicas.

BRwBR: plásmido B.R.>w>B.R. descrito en Roseman et al. 1993. *The EMBO Journal* 12, 2:435-442. Incluye una secuencia conocida de *Drosophila melanogaster* con actividad aisladora, descrita inicialmente en el elemento *gypsy*. Se utiliza como control positivo de secuencia aisladora.

pCaSpeRW15*: plásmido pCaSpeRW15 (Roseman et al. 199. *The EMBO Journal* 12, 2:435-442) modificado en su polilinker. No se usa para la generación de moscas transgénicas pero es la base de los clonajes de las construcciones experimentales. Para obtenerlo, la banda de 1,8 kb obtenida por digestión del pCaSpeR3 se clona en el vector pCaSpeRW15 digerido también por SacI. Este plásmido solo difiere del pCaSpeR3 usado como control en la presencia de un sitio *EcoRI* presente en 3' del minigen *white*, necesario para la obtención de las construcciones experimentales.

5'HS4w5'HS4: El fragmento 5'HS4 del gen de la β -globina de pollo (Chung et al. 1993. *Cell* 74:505-514) en dos copias (1,2 kb x 2 = 2,4 kb) se obtiene por digestión con *XbaI* del plásmido pBC1 (Invitrogen) y se clona en un plásmido Bluescript (BS KSII+, Stratagene) para poder transferirla ahora como una banda *BamHI-NotI* que se inserta en 5' del minigen *white* del plásmido pCaSpeRW15* digerido igualmente con *BamHI-NotI*. Para su clonaje en 3' del minigen *white* se hacen extremos romos de la banda y del vector pCaSpeRW15* digerido con *EcoRI*. Esta construcción es un control positivo, con una secuencia conocida de un vertebrado (del pollo) con actividad aisladora.

XwX: El fragmento X se obtiene a partir del plásmido pTyr14:E6 (Ganss et al. 1994. *The EMBO Journal* 13, 13:3083-3093) digerido con *StyI* (véase la Figura 1) y se clona en sitio *XbaI* del pCaSpeRW15* tras generar extremos romos en ambos fragmentos de ADN. El plásmido obtenido contiene el fragmento X en 5' del minigen *white*. Para incluir el fragmento X en la región 3' del minigen *white* se digiere con *EcoRI*, se hacen extremos romos y se clona en ese sitio la misma banda X utilizada en 5', pero con extremos romos.

HSwHS: La región HS se obtiene a partir del plásmido pTyr14:E6 (Ganss et al. 1994. The EMBO Journal 13, 13:3083-3093) digerido con *XbaI-EcoRI* (véase la Figura 1), se hacen extremos romos y se clona en el sitio *XbaI* hecho romo del pCaSpeRW15*. En este paso se genera un sitio *EcoRI* al final de la zona HS que se elimina mediante digestión parcial del plásmido y selección de aquellas moléculas que lo han eliminado y presentan un sitio *EcoRI* único al final del minigen *white* en el que se clona posteriormente de nuevo la zona HS mediante digestión del plásmido con *EcoRI* y generación de extremos romos.

TE3wTE3: El fragmento TE3 de 1,7 kb se obtiene a partir del plásmido pgTYR-H1,8A (Ruppert et al. 1988. EMBO J 7:2715-2722) mediante digestión con *HindIII*, se hacen extremos romos y se clona en el sitio *XbaI* hecho romo del pCaSpeRW15*. La misma banda se clona después en el sitio *EcoRI* hecho romo del plásmido generado. Esta construcción contiene el tercer exon del gen de la tirosinasa junto a secuencias intrónicas circundantes [véase la Figura 3] como control negativo del experimento.

LCRwLCR: El fragmento LCR se obtiene a partir del plásmido pTyr14:E6 (Ganss et al. 1994. EMBO J 13:3083-3093) digerido con *EcoRI*, se hacen extremos romos y se clona en el plásmido pCaSpeRW15* digerido con *BamHI-NotI* y hechos extremos romos. El plásmido generado se digiere con *EcoRI* para el clonaje dirigido de la banda LCR.

LCRmutwLCRmut: El fragmento LCRmut se obtiene a partir del fragmento LCR por digestiones parciales que consiguen eliminar la secuencia de ADN entre los sitios *StyI-DdeI* que contiene la caja AB (véase la Figura 1). El fragmento resultante se clona en un vector Bluescript (BS KSII+, Stratagene) para su manipulación. La obtención de la construcción LCRmutwLCRmut se realizó de forma análoga a la descrita para LCRwLCR.

25 *Obtención de moscas transgénicas*

El procedimiento de obtención de moscas (*Drosophila melanogaster*) transgénicas se realizó básicamente de la forma descrita por Rubin y Spradling 1982 (Science, 218:348-353). Se prepara una solución en tampón de microinyección (Tris-HCl 10 mM pH=7,5, EDTA 0,1 mM pH=8) del ADN de la construcción a una concentración de 0,4 mg/ml y del ADN plásmidico pn25.7 a una concentración de 0,1 mg/ml que contiene el gen que codifica para la transposasa, enzima necesaria para que se lleve a cabo el proceso de inserción del ADN en el genoma de la mosca. Esta solución resultante, conservada a 4°C, es la que se inyectará en los embriones de mosca.

Las cepas de *Drosophila melanogaster* que se utilizaron como hospedadoras fueron, en este caso w1118 ó Df ac1 w1118, portadoras de la misma mutación inactivadora del gen *white* (Bloomington Stock Centre, Indiana University, USA; <http://flystocks.bio.indiana.edu/>). Las moscas se colocan en cubiletes de puesta la noche anterior, con levadura en la placa de agar. Es conveniente que las moscas sean jóvenes, y que estén fertilizadas. Por la mañana, se cambian las placas y se dejan las moscas a 25°C y en oscuridad durante media hora. Pasado ese tiempo se recogen los huevos de las placas de agar con ayuda de agua y un pincel. Para ello, se echa agua en la placa hasta que los embriones se desprenden de la misma y se vierte en un filtro colocado sobre una trompa de vacío, que eliminará el líquido. Una vez secos y sobre el filtro, se hace un lavado de dos minutos con lejía, para eliminar el corion. Pasados los dos minutos, se retira la lejía, y se realizan tres lavados con agua.

A partir de este momento se trabaja en una habitación climatizada a 18°C, para que los embriones se desarrollen más lentamente que a temperatura ambiente. Los embriones se disponen de tal forma que queden alineados todos con el micropilo en la misma orientación. Una vez alineados, se adhieren a un portaobjetos de microscopio óptico previamente impregnado de pegamento fabricado con heptano y papel adhesivo (cello) de doble cara. Tras esto, los embriones se secan durante 20 minutos en sílica gel a una temperatura de 20°C-22°C.

Se carga el ADN en la aguja, fabricada por extensión de un capilar. Se coloca la aguja en el microscopio y se le rompe levemente la punta contra el borde de un cubre pegado sobre un porta, con aceite de inmersión. Después del secado de los embriones se les recubre con aceite de inmersión, sin excederse, pues eso podría ahogar a las futuras larvas. Se coloca el porta con los huevos en el microscopio y se inyecta por el lado contrario al micropilo. Para inyectar el ADN la aguja debe estar lo suficientemente fina como para no romper el embrión.

Una vez inyectado el ADN se retira el portaobjetos del microscopio y se deja sobre una placa de agar a temperatura ambiente. Los portaobjetos que contienen los embriones inyectados se dejan a temperatura ambiente y a partir de las 24 horas se pueden empezar a recoger las larvas. Éstas/ se pasan a tubos

con papilla hasta un máximo de 100-110 larvas por tubo y se almacenan en cámara de 25°C hasta que empiecen a salir las moscas. Cuando esto ocurre se recoge la generación denominada G₀, separando los machos de las hembras vírgenes que se cruzan individualmente con moscas de la estirpe hospedadora para la detección de individuos transformantes (transgénicos).

5

Se obtienen los transformantes P[w+], se establece un stock homocigótico y se lleva a cabo la localización cromosómica de la inserción. Esto se realiza mediante el cruce de los machos P[w+] con hembras w¹¹¹⁸; If/CyO; TM2/MKRS (véase Lindsley and Zimm. 1992. The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press Inc. San Diego, CA, para el significado de los marcadores).

10

Para el análisis del color de los ojos en las moscas transgénicas en heterocigosis se utilizan machos del stock homocigótico que se cruzan con hembras vírgenes del stock w¹¹¹⁸. Se recogen entre 30 y 50 hembras vírgenes de la F₁ y se separan en viales con papilla para la posterior observación, después de 72 horas, del color de ojos. Se anota el color de los ojos adjudicando a cada individuo una pigmentación perteneciente a alguna de las siguientes cinco categorías (de mayor a menor intensidad de pigmentación): red (=wild-type o salvaje), brown, orange, pale orange y yellow.

15

Para el análisis del color de los ojos en las moscas transgénicas en homocigosis se utilizan entre 30 y 50 moscas hembras vírgenes del stock homocigótico las cuales se seleccionan y separan en viales con papilla para la posterior observación, después de 72 horas, del color de ojos. Se anota el color de los ojos adjudicando a cada individuo una pigmentación perteneciente a alguna de las siguientes cinco categorías (de mayor a menor intensidad de pigmentación): red (=wild-type o salvaje), brown, orange, pale orange y yellow.

20

Se ha realizado un experimento de protección de efectos de posición en moscas transgénicas, utilizando el minigen white (que confiere coloración a los ojos de las moscas) sobre moscas white- (mutantes, de ojos blancos). El minigen white tiene un potencial de expresión limitado (da una coloración entre amarilla y anaranjada) pero se utiliza en experimentos de transferencia génica dado que "lee" (descubre) los efectos de posición del lugar de inserción en el genoma de la mosca de forma excelente (véanse por ejemplo: Chung et al. 1993, citado *supra*; Roseman et al. 1993, citado *supra*; Vazquez & Schedl 1994, citado *supra*; Namciu et al. 1998. Mol Cell Biol. Human matrix attachment regions insulate transgene expression from chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*. 18:2382-2391). Mayormente, los efectos de posición detectados son de tipo activador (el color de los ojos se acentúa por encima de las capacidades del minigen al quedar éste situado en las cercanías de algún elemento regulador positivo del genoma de la mosca). Una secuencia aisladora que proteja frente a estos efectos de posición retornará al transgén a su potencial real de expresión, aislándola del influjo de secuencias vecinas. Por lo tanto, sus ojos aparecerán más claros y cercanos a yellow o a pale-orange.

25

30

35

Para evaluar los efectos de posición se utilizaron 8 construcciones génicas (véanse las Tablas 1 y 2 y las Figuras 3, 6 y 7). En individuos heterocigotos (véase la Tabla 1 y la Figura 6), la primera (w) de referencia, contiene solamente el minigen white. Las 24 líneas independientes de moscas transgénicas obtenidas con w y analizadas varían en coloración de yellow a red. Como control negativo experimental se utilizó el exon 3 y sus secuencias intrónicas colindantes del gen mismo de la tirosinasa de ratón (TE3wTE3). En este caso, las 20 líneas independientes de moscas transgénicas obtenidas también variaban entre yellow y red, no obteniéndose protección significativa debido a las secuencias de ratón no relacionadas con la región LCR experimental, pero pertenecientes al mismo gen de la tirosinasa de ratón.

40

45

Como controles positivos del experimento se utilizaron dos secuencias aisladoras bien conocidas: la 5'HS4 [con el insulator del locus de las β-globinas de pollo (Chung et al. 1993, citado *supra*)] y la BR [con el insulator del Supresor of Hairy Wing (SuHw) del elemento retrotransponible gypsy en *D. melanogaster* (Roseman et al., 1993, citado *supra*)]. La primera de ellas, 5'HS4w5'HS4, porta una duplicación del elemento de 1,2 kb descrito a cada lado del minigen white. Se observa un desplazamiento, en número, de las 19 líneas de moscas transgénicas analizadas, hacia coloraciones más claras (debido al efecto de protección frente a efectos de posición). No obstante, siguen apareciendo individuos (un 11.3% de todos los individuos contabilizados) con tonalidades de ojos oscuras (brown y red), en los cuales no ha ocurrido el efecto de aislamiento. Se observa, de forma más clara, el efecto de protección frente a efectos de posición con la construcción de la secuencia de ADN de unión a la proteína SuHw (BRwBR). Las 13 líneas de moscas transgénicas analizadas mantienen la mayoría de sus individuos en coloraciones orange, pale orange o yellow.

50

55

60

En las cuatro construcciones experimentales HS_wHS (10 líneas de moscas transgénicas analizadas), X_wX (8 líneas de moscas transgénicas analizadas), LCR_wLCR (21 líneas de moscas transgénicas anali-

zadas) y LCRmutwLCRmut (13 líneas de moscas transgénicas analizadas) se observa un claro desplazamiento de las tonalidades de los ojos hacia colores claros (*pale orange* y *yellow*), en especial en la construcción HS_wHS, que es la que manifiesta el mayor poder de aislamiento o capacidad *insulator*. De este experimento se puede concluir que la secuencia LCR (SEC. ID. N°: 1) del gen de la tirosinasa de ratón y sus derivadas (HS, X y LCRmut) contienen una actividad aisladora de los efectos de posición cromosomales. Esta actividad no depende de la presencia de la zona HS (cajas A y B) pues en su ausencia (LCRmut) se obtienen niveles similares de aislamiento.

Por otra parte, los resultados obtenidos en los experimentos comparativos realizados entre la secuencia aisladora de referencia en vertebrados (5'HS4) y las de esta invención ponen de manifiesto que estas últimas proporcionan una mejor protección de los efectos de posición en moscas transgénicas.

La Tabla 1 resume los resultados obtenidos con las construcciones génicas analizadas en moscas transgénicas heterocigotas, correspondientes a los individuos mostrados en la gráfica de barras de la Figura 6.

La Tabla 2 resume los resultados obtenidos con las construcciones génicas analizadas en moscas transgénicas homocigotas, correspondientes a los individuos mostrados en la gráfica de barras de la Figura 7.

La evaluación de la protección de los efectos de posición en moscas transgénicas homocigotas confirma los resultados obtenidos en individuos transgénicos heterocigotos de las mismas líneas, enfatizando las diferencias entre secuencias con actividad aisladora (BR, 5'HS4, LCR, LCRmut, HS y X) y los correspondientes controles negativos (w y TE3). Nuevamente se observa un mejor comportamiento de la molécula de ADN LCR y sus derivadas (LCRmut, HS y X, en especial HS) frente a moléculas de ADN con actividad aisladora conocida (BR y 5'HS4). En homocigosis se aprecian ligeras diferencias entre los fragmentos LCR y LCRmut (así como entre los fragmentos HS y X) que sugieren que si bien no es necesaria la caja AB para obtener actividad aisladora su presencia colabora a organizar un aislamiento eficaz. Las mismas líneas de moscas transgénicas han sido analizadas tanto en heterocigosis (véase la Figura 6) como en homocigosis (véase la Figura 7) excepto una línea (de w), dos (de TE3wTE3), dos (de 5'HS4w5'HS4), una (de LCRwLCR), una (de LCRmutwLCRmut) y una (de BRwBR) para las cuales no fue posible obtener individuos homocigotos.

TABLA 1

Resumen de las construcciones génicas analizadas en moscas transgénicas heterocigotas

	red	brown	orange	pale orange	yellow
w	+	+	+	++	-
HS _w HS	-	-	-	+	++
X _w X	+	-	+	++	+
BR _w BR	-	-	+	++	+
LCR _w LCR	-	-	+	++	+
LCRmut _w LCRmut	-	-	+	++	+
5'HS4 _w 5'HS4	+	+	+	++	+
TE3 _w TE3	+	+	+	++	+

TABLA 2

Resumen de las construcciones génicas analizadas en moscas transgénicas homocigotas

		red	brown	orange	pale orange	yellow
5	w	++	+	+	+	-
	HSwHS	-	-	+	++	+
10	XwX	+	-	++	+	+
	BRwBR	+	+	++	+	-
	LCRwLCR	+	-	++	+	+
	LCRmutwLCRmut	+	-	++	+	+
15	5'HS4w5'HS4	+	+	++	+	+
	TE3wTE3	+	+	++	+	+

Nota: La categoría que contiene el mayor número de individuos se ha identificado, en cada caso, con dos cruces (++) . La presencia de actividad aisladora se detecta tanto por una disminución de la variabilidad en la pigmentación de los ojos como por una mayor presencia de las categorías de ojos claros (*orange*, *pale orange* y *yellow*). En individuos homocigóticos se intensifica proporcionalmente la pigmentación de los ojos debido a la presencia de dos copias de la construcción. [Véanse las Figuras 6 y 7 con la representación gráfica de todas las líneas de moscas transgénicas analizadas, tanto en heterocigosis (Figura 6) como en homocigosis (Figura 7)].

Ejemplo 3

Generación de ratones transgénicos con capacidad de garantizar la protección de una construcción génica experimental frente a los efectos de posición cromosomales en el genoma del ratón

Materiales y métodos

Construcciones utilizadas en ratones transgénicos (Véase la Figura 4).

pTLuc: El fragmento *SspI-BamHI* de 1,8 kb obtenido a partir del plásmido pDO432 (Rodríguez et al. 1988. Proc. Natl Acad. Sci. USA 85: 1667-1671) y que contiene el gen de la luciferasa, se clonó en el vector pW37SP1 (Montoliu et al. 1995. Proc. Natl Acad. Sci. USA 92: 4244-4248) digerido con *SmaI-BglII*, que aporta el promotor mínimo (caja *TATA box*, -35 pb, del gen de la timidina kinasa del HSV) junto a dos sitios de unión del factor de transcripción ubicuo Sp1 (Saffer et al. 1991. Mol. Cell. Biol. 11: 2189-2199; Marin et al. 1997. Cell 89: 619-628).

pHSTLuc: El fragmento HS de 2, 1 kb se obtuvo a partir del plásmido pTyr14:E6 (Ganss et al. 1994. The EMBO Journal 13, 13:3083-3093) digerido con *XbaI-EcoRI* (véase la Figura 1) y se clonó en el sitio *SalI* del pTLuc, a través de extremos romos en ambas moléculas de ADN.

pLCRTLuc: El fragmento *EagI-AflII* de 3,0 kb obtenido del plásmido pTyr14:E6 (Ganss et al. 1994. The EMBO Journal 13, 13:3083-3093), se clonó en el plásmido pHSTLuc digerido con idénticas enzimas de restricción, de esta forma se completó el fragmento HS para obtener el LCR (véase la Figura 1).

Obtención de ratones transgénicos

Los ratones transgénicos se obtuvieron, siguiendo la metodología habitual (Hogan et al. eds. 1994. Manipulating the mouse embryo, CSHLP) por microinyección de oocitos fertilizados de las cepas albinas NMRI ó FVB/N (Harlan Ibérica), con una solución de ADN en tampón de microinyección (Tris-HCl 10 mM pH=7,5, EDTA 0,1 mM pH=8) a una concentración de 2 ng/ μ l. Los oocitos se incubaron 16 horas, en un incubador de CO₂ a +37°C en medio de cultivo M16. Solamente aquellos embriones que pasaron al estadio siguiente del desarrollo (2 células) se transfirieron a oviductos de hembras pseudogestantes CD1 para su gestación. La presencia del ADN de las construcciones transgénicas en el genoma de todas las crías nacidas se analizó mediante técnicas de PCR, *slot-blot* y *Southern-blot*. La estimación del número de copias de las construcciones transgénicas integradas en el genoma del ratón se efectuó en individuos de la primera generación (F₁) por *slot-blot*, a partir de estándares con cantidades conocidas (Ausubel et al. eds. 1990. Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Inters-

ciencia). Los individuos identificados como portadores del transgen (fundadores) se cruzaron con ratones albinos NMRI para generar las líneas de transgénicos independientes. Se obtuvieron y analizaron 5 líneas independientes para los transgenes pTLuc y pHSTLuc y 8 para el transgen pLCRTLuc.

5 *Cuantificación de la actividad luciferasa en ratones transgénicos* (véase la Tabla 3 y las Figuras 5A, 5B y 5C)

10 Para la cuantificación de la actividad luciferasa en tejidos, se utilizaron 6 ratones adultos (de 2 a 3 meses de edad) de cada línea. De cada uno de ellos se extrajeron muestras de los siguientes tejidos: piel de la región dorsal [BS], ojos (los dos) [E], músculo esquelético [M], intestino delgado [TG], riñón [K], bazo [S], hígado [L], pulmón [N] y cerebro [B]. Las abreviaturas corresponden a las utilizadas en las Figuras 5A, 5B y 5C. Los tejidos extraídos se mantuvieron congelados a -80°C hasta el momento de su utilización.

15 Para la obtención de extractos proteicos, se homogeneizaron los tejidos con un homogeneizador tipo Politron (Ultra-Turrax T8, IKA labortechnik) en 500 μ l de tampón de lisis (*Cell Culture Lysis Reagent*, Promega), las muestras se centrifugaron a v_{max} en tubos Eppendorf de 1,5 ml durante 5 min a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, el cual se mantuvo congelado a -80°C hasta el momento de su utilización.

20 La cuantificación de actividad luciferasa se realizó a partir del extracto proteico (10 μ l) en placas de 96 pocillos blancas y midiendo RLUs emitidas en un luminómetro (Microplate Luminometer LB96V, EG&G Berthold) usando como sustrato de reacción 50 μ l del *Luciferase Assay Reagent* (Promega), siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante. Para normalizar las medidas se valoró la concentración de proteína mezclando 2 μ l de una dilución 1/26 del extracto proteico con 200 μ l del Bio-Rad Protein assay (Bio-Rad) en placas de 96 pocillos y midiendo absorbancia a 620 nm en un lector de Elisa (Titerket Multiskan MCC/340). La curva patrón se realizó con γ -globulina bovina (Bio-Rad). Los datos se expresaron como RLUS por microgramo de proteína, el valor de cada línea en cada tejido corresponde a la media de los seis individuos analizados (+/- desviación standard).

30 A diferencia de los experimentos análogos realizados con moscas transgénicas (véase el Ejemplo 2), en el caso de los ratones transgénicos no se pudieron analizar, por razones obvias, un número similar de construcciones ni de líneas independientes y/o individuos. No obstante, tal y como se indica en la figura correspondiente mostrada más arriba, se prepararon ratones transgénicos con tres construcciones 35 génicas: pTLuc, pHSTLuc y pLCRTLuc (Figura 4). Los resultados obtenidos del análisis de la actividad del transgén indicador (luciferasa) en diferentes tejidos correspondientes a 6 individuos por cada línea se recogen en la Tabla 3 y se muestran en la Figura 5, que representa la actividad luciferasa medida en nueve órganos distintos de seis individuos por cada línea independiente de ratones transgénicos. Las actividades del transgén indicador han sido normalizadas refiriéndolas a proteína total presente en el 40 extracto proteico en cada caso.

TABLA 3

Resultados del análisis de la actividad luciferasa

45	pTLuc	5 líneas independientes, número de copias: 2, 3, 3, 4, (5) 4 expresan a bajo nivel en pocos tejidos
50	pHSTLuc	5 líneas independientes número de copias: (1), (1), 1, 2, 3 3 expresan a medio-alto nivel en muchos tejidos
55	pLCRTLuc	8 líneas independientes número de copias: 1, 5, 5, 8, 7, 13, 21, 187 8 expresan a medio-alto nivel en muchos tejidos

Nota: Entre paréntesis se indican las líneas para las que no se ha detectado expresión.

60 Los resultados obtenidos en ratones transgénicos demuestran que la presencia de la secuencia HS y (mejor) la secuencia LCR permiten rescatar la expresión multitisular de un transgén experimental pTLuc, constituido por una caja TATA de inicio de transcripción y dos sitios de unión a un factor de transcripción de expresión generalizada (Sp1) [Saffer et al. 1991, citado *supra*; Marin et al. 1997, citado *supra*]. Los niveles y presencia de expresión del transgén pTLuc son muy bajos, y por lo tanto sensibles a los efectos

de posición. Sin embargo, cuando se adicionan las secuencias HS y LCR aparecen líneas de ratones transgénicos con expresión del transgén indicador en múltiples tejidos. Las secuencias LCR (SEC. ID. N°: 1) merecen una mención especial pues con ellas la totalidad de las líneas de ratones transgénicos obtenidas (8/8) se expresan a buen nivel en múltiples órganos.

5

En base a este experimento se puede concluir que la adición de las secuencias HS o, mucho mejor, las secuencias LCR, permite garantizar la expresión de la construcción experimental utilizada. La secuencia LCR no actúa como un mero activador transcripcional específico de tejido (del gen de la tirosinasa, en este caso) pues la expresión del gen indicador de la luciferasa se encuentra de forma notable en tejidos en los que no existe la expresión del gen endógeno (músculo, hígado, cerebro, etc. [véase la Figura 5]). Por ello, se puede concluir (de forma análoga a los datos que se obtienen de las moscas transgénicas [véase el Ejemplo 2]) que la adición de las secuencias HS o, mejor, LCR consigue independizar la construcción génica del sitio de integración en el genoma, detectándose expresión del gen indicador en la mayoría (HS) o todas (LCR) las líneas de ratones transgénicos analizadas. No se observa una relación clara entre el número de copias y el nivel de expresión de las construcciones (véanse la Tabla 3 y las Figuras 5A, 5B y 5C), de forma similar a lo que se observa al utilizar la secuencia aisladora 5'HS4 en ratones transgénicos (Potts et al. 2000, citado *supra*).

Ejemplo 4

20

Ejemplo comparativo

Con fines comparativos, se discuten experimentos de protección de efectos de posición similares en ratones transgénicos utilizando una secuencia aisladora perteneciente al estado de la técnica (5'HS4) y la molécula aisladora LCR de la invención (SEC. ID. N°: 1). Los resultados obtenidos vuelven a poner de manifiesto que los mejores resultados relativos a garantizar la expresión de las construcciones en ratones transgénicos se obtienen con la molécula LCR.

25

La molécula de ADN denominada LCR se utilizó para mejorar la expresión de los minigenes de tirosinasa en ratones transgénicos. En la Figura 3 del artículo de Ganss et al. 1994 (citado *supra*) se mostraban diferentes líneas de ratones transgénicos en los que se les ha añadido la secuencia LCR a un minigen funcional de la tirosinasa de ratón (Ganss et al. 1994, citado *supra*; Montoliu L. 1994. Fade to grey. *Current Biology* 4:1025). Se observó que el nivel de expresión conseguido era superior, menos variable (no hay variegación observable) y proporcional al número de copias del transgén insertadas en el genoma del ratón (cuantas más copias integradas la pigmentación obtenida fue más intensa). Es necesario destacar que cuando se publicaron los trabajos citados se desconocía la actividad aisladora de efectos de posición de la región LCR.

30

35

Al comparar los ratones transgénicos mencionados en el párrafo anterior con las fotografías aportadas para ilustrar la publicación de Potts et al. 2000 (citado *supra*, Figura 3 de ese trabajo) se observan diferencias significativas. En este caso también se utilizan transgenes de tirosinasa para evaluar los efectos de posición, a los que se añade la secuencia aisladora conocida 5'HS4. La presencia de intensidades de pigmentación mucho más débiles junto con la mayor variabilidad y aparición de variegación en el segundo caso sugiere una mayor eficacia de la secuencia LCR, objeto de la presente invención. La secuencia LCR funciona mejor que la secuencia 5'HS4, aunque debe tenerse en cuenta que en este caso la LCR es la propia del gen de la tirosinasa, que se utiliza como gen indicador. De igual manera se puede concluir que la secuencia LCR es, por lo menos, igual de eficaz, sino más, que la secuencia 5'HS4 en la protección de efectos de posición en ratones transgénicos. Estos datos se ven corroborados por los obtenidos en ratones transgénicos con las construcciones pTLuc, pHSTLuc y pLCRTLuc, los cuales demuestran que la presencia de la secuencia HS o LCR incrementa la garantía de expresión de los transgenes *in vivo*.

40

45

50

Una ventaja de la secuencia LCR frente a la secuencia 5'HS4 es que esta última (5'HS4) requiere la presencia de múltiples elementos (por lo menos dos unidades del elemento de 1,2 kb de secuencia de ADN del gen de la β -globina de pollo a cada lado de la construcción génica experimental, en total cuatro), mientras que la secuencia LCR (y sus derivadas más pequeñas) han manifestado su actividad protectora de efectos de posición en copia simple (ratones transgénicos) o doble (5' y 3', en moscas transgénicas). La presencia de una misma secuencia repetida múltiples veces puede acarrear problemas de clonaje y estabilidad de la construcción en bacterias e inducir a su inactivación en el genoma del organismo hospedador.

55

60

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- 5 a) la secuencia de nucleótidos identificada como SEC. ID. N°: 1, o un fragmento de la misma; y
b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a).

2. Molécula de ADN según la reivindicación 1, que presenta actividad aisladora de efectos de posición cromosomales en procesos de transferencia génica en células de animales.

10 3. Molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1.

4. Molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, seleccionada del grupo formado por las moléculas de ADN:

15 LCRmut: idéntica a SEC. ID. N°: 1 excepto por una delección de 59 pb entre las posiciones 2.622 y 2.683, inclusive, de la SEC. ID. N°: 1;

20 HS: constituida por la secuencia de nucleótidos contenida entre el nucleótido 1.583 y el 3.711 de la SEC. ID. N°: 1; y

X: constituida por la secuencia de nucleótidos contenida entre el nucleótido 222 y el 2.617 de la SEC. ID. N°: 1; y

25 un fragmento de 1.034 pb que contiene la secuencia de nucleótidos contenida entre el nucleótido 1.583 y el 2.617 de la SEC: ID. N°: 1.

30 5. Una construcción de ADN que comprende (i) al menos, una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y, (ii) al menos, una unidad de transcripción que comprende un gen de interés, un promotor que dirige la transcripción de dicho gen de interés y una señal de terminación de la transcripción (poliadenilación).

35 6. Construcción según la reivindicación 5, que contiene, al menos, 2 moléculas de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, iguales o diferentes, en forma de tándem con orientaciones directas y/o invertidas.

40 7. Construcción según la reivindicación 6, que contiene una primera molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en posición 5' (*upstream*) respecto a dicha unidad de transcripción y una segunda molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, igual o diferente a la primera, con la misma orientación o con la orientación contraria, en posición 3' (*downstream*) del gen de interés.

8. Un vector que comprende una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.

45 9. Vector según la reivindicación 8, seleccionado entre un plásmido y un virus.

50 10. Una célula de animal que comprende una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, o un vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9.

11. Un animal no humano transgénico que comprende, al menos, una célula de animal transgénica según la reivindicación 10.

55 12. Un kit que comprende, al menos, una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, o un vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9.

60 13. Un método para producir células de animales recombinantes que comprende transformar células de animales con una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, o con un vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, bajo condiciones en las que dichas células pueden ser transformadas.

14. Un método para introducir transgenes en células de animales que comprende transformar células de animales con una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, o con un vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, bajo condiciones en las que dichas células pueden ser transformadas.

5

15. Un método para reducir la variabilidad de la expresión de transgenes en células de animales que comprende transformar células de animales con una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, o un vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, bajo condiciones en las que dichas células pueden ser transformadas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

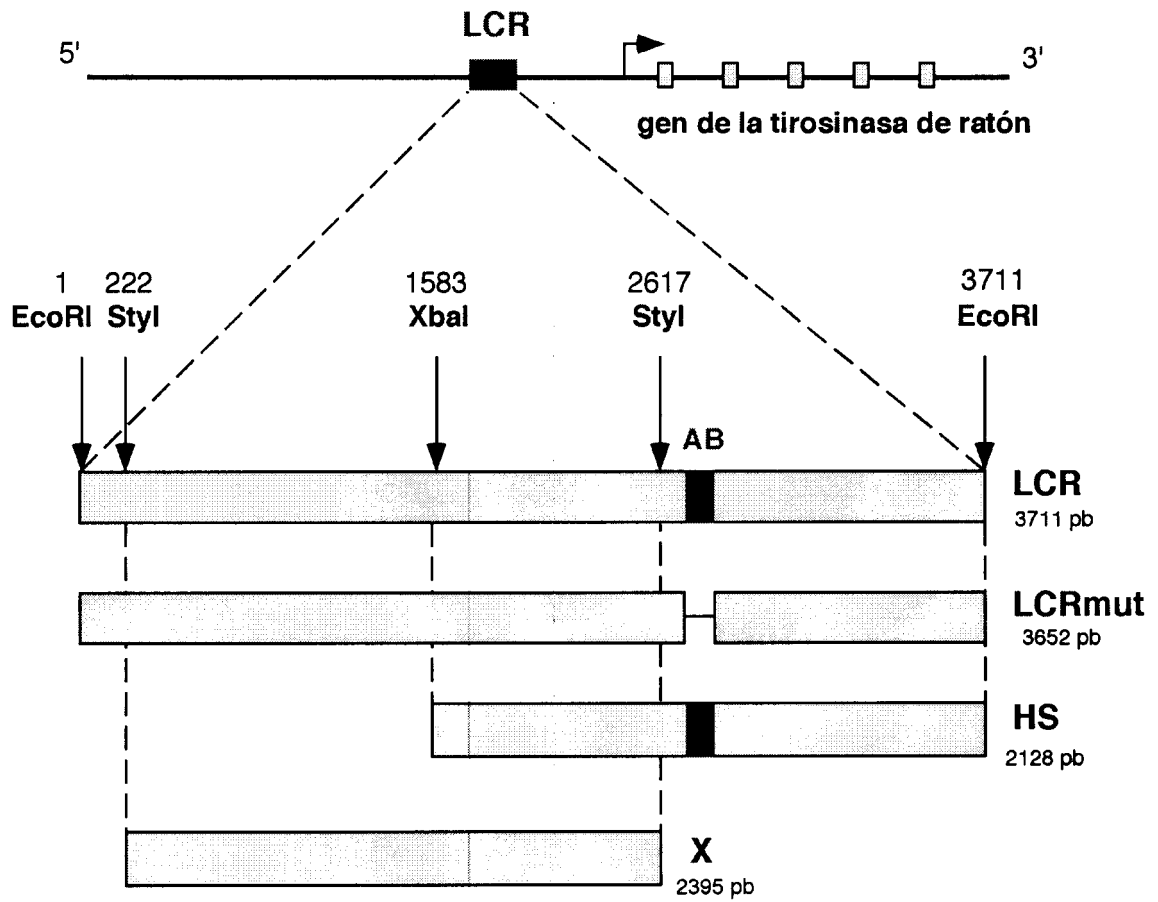


FIGURA 1

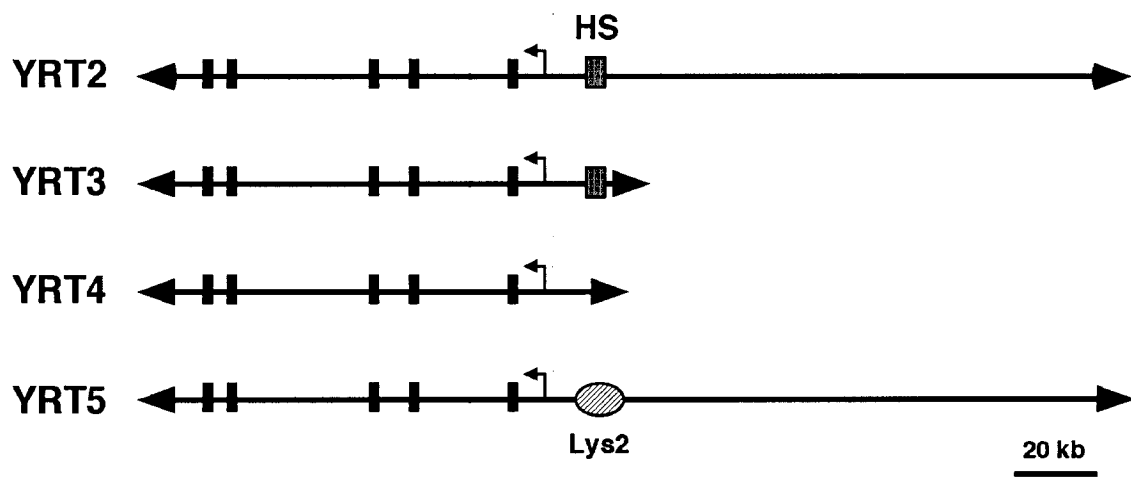


FIGURA 2

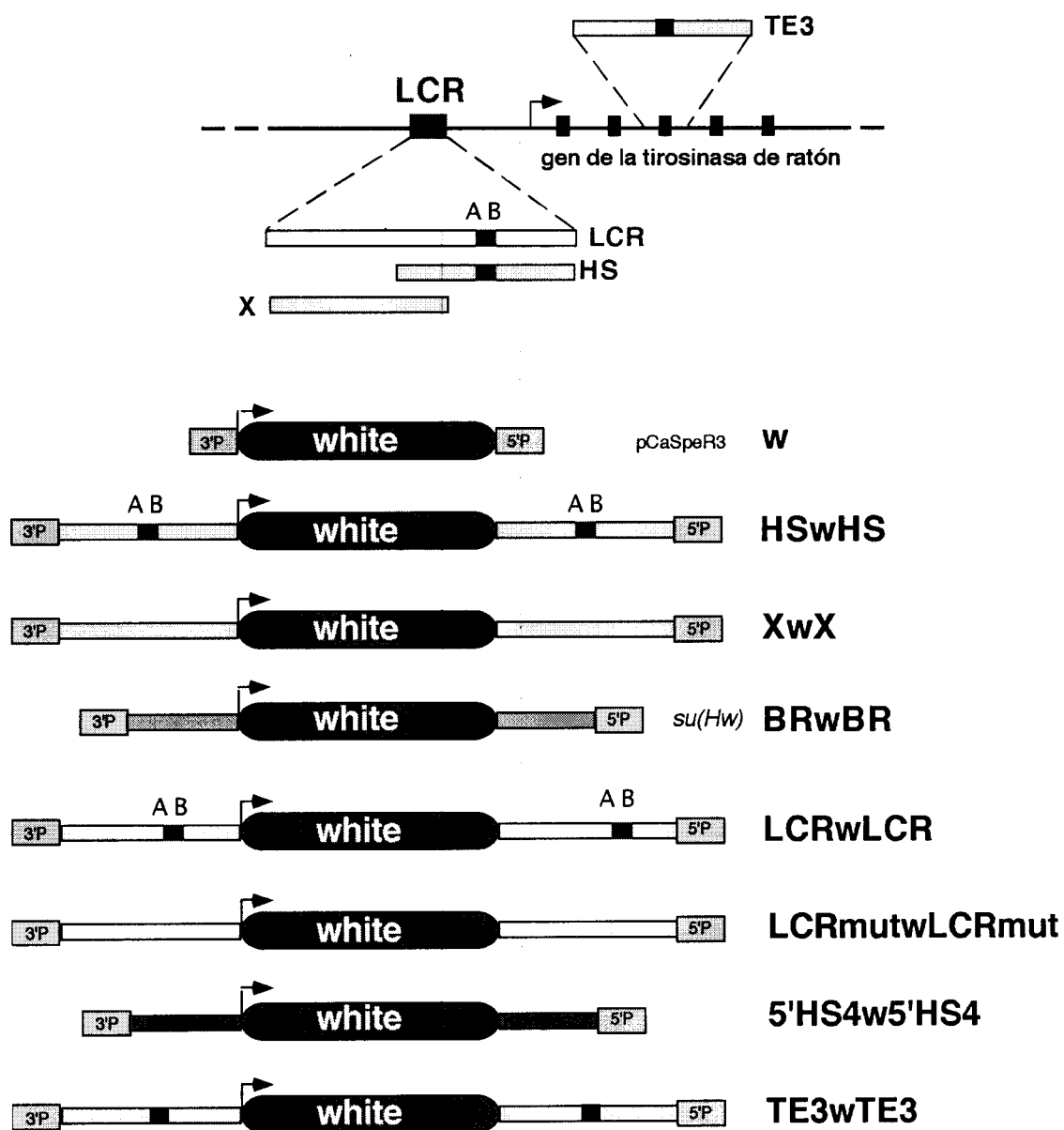


FIGURA 3

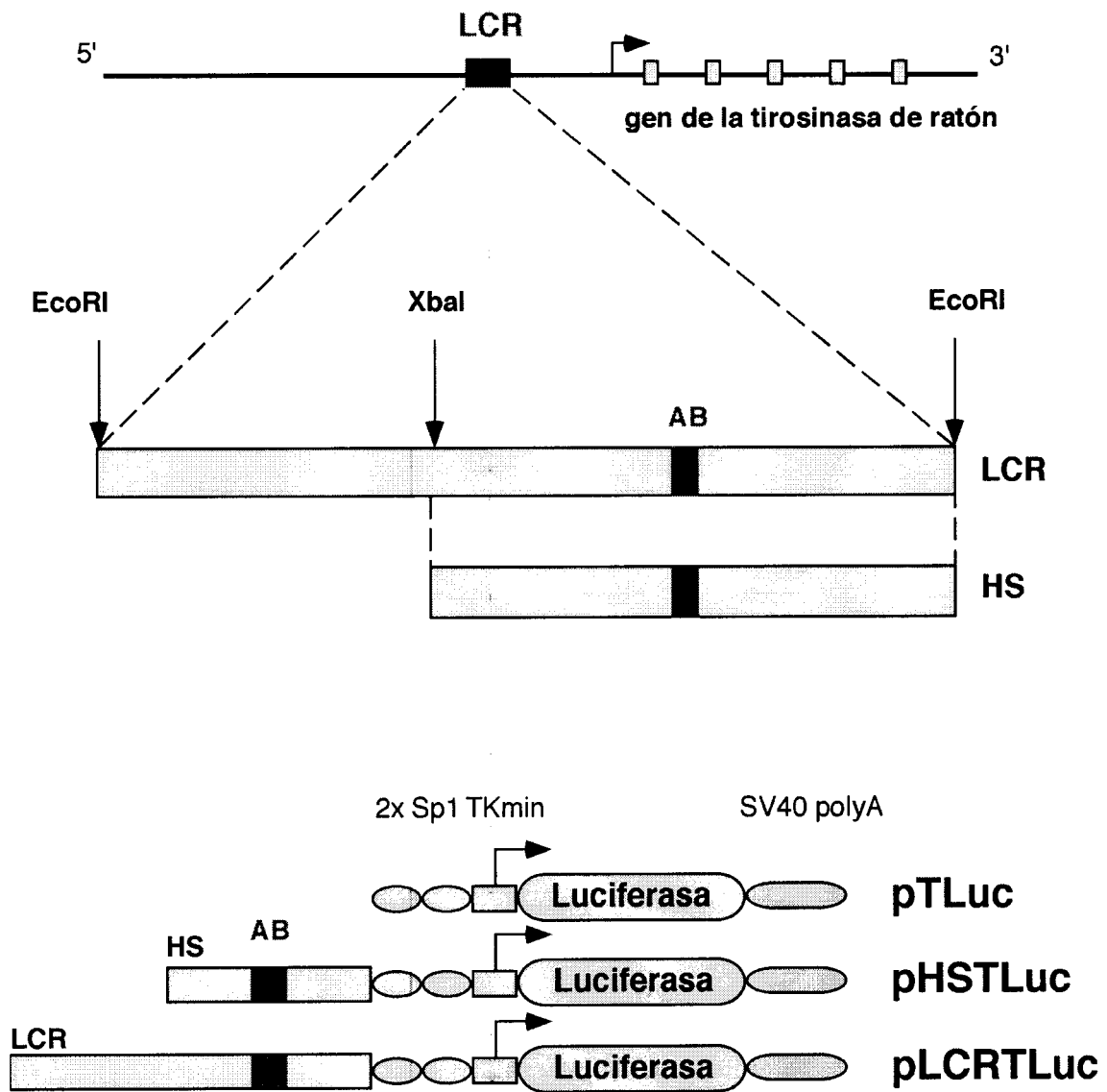


FIGURA 4

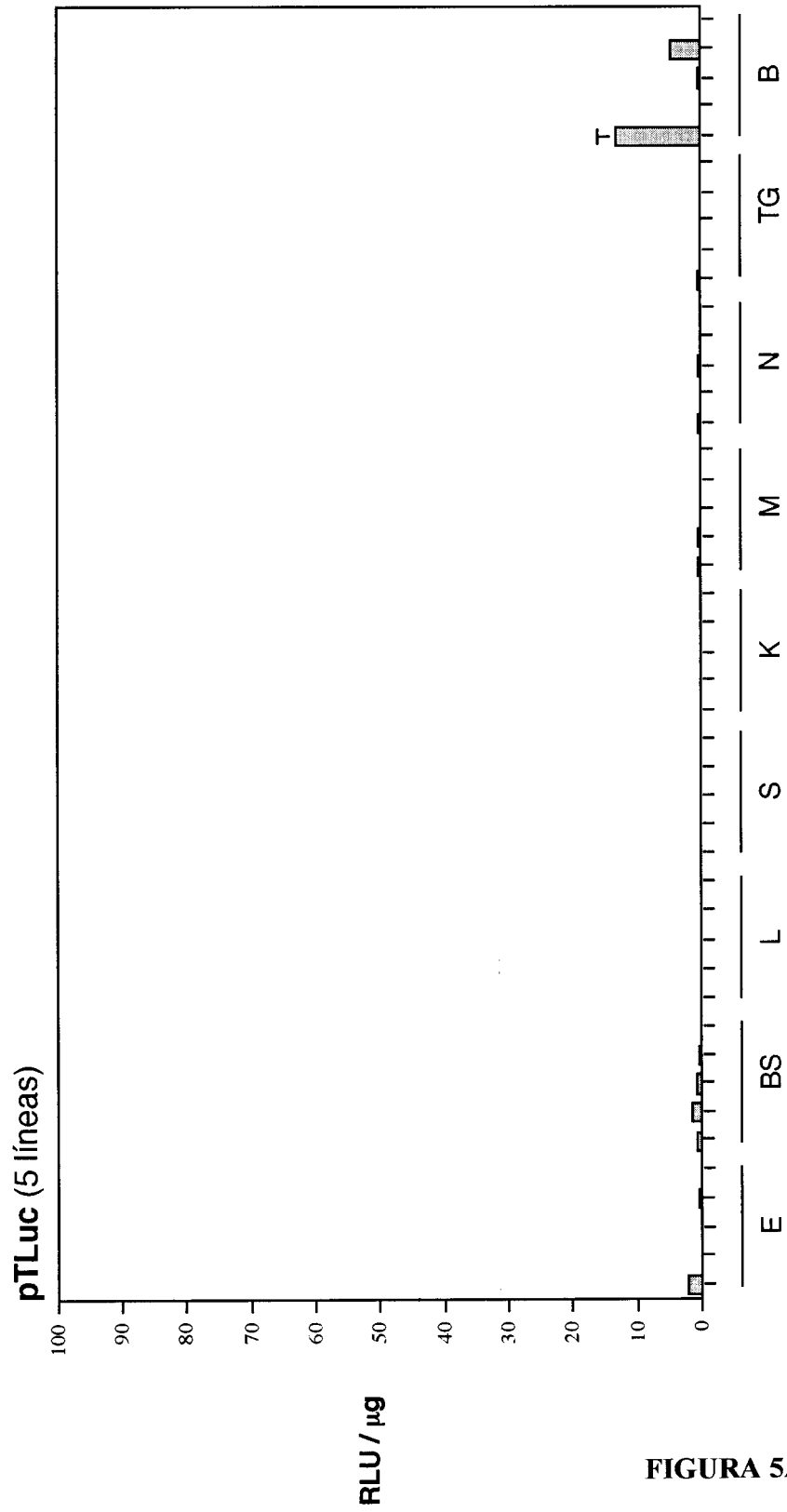


FIGURA 5A

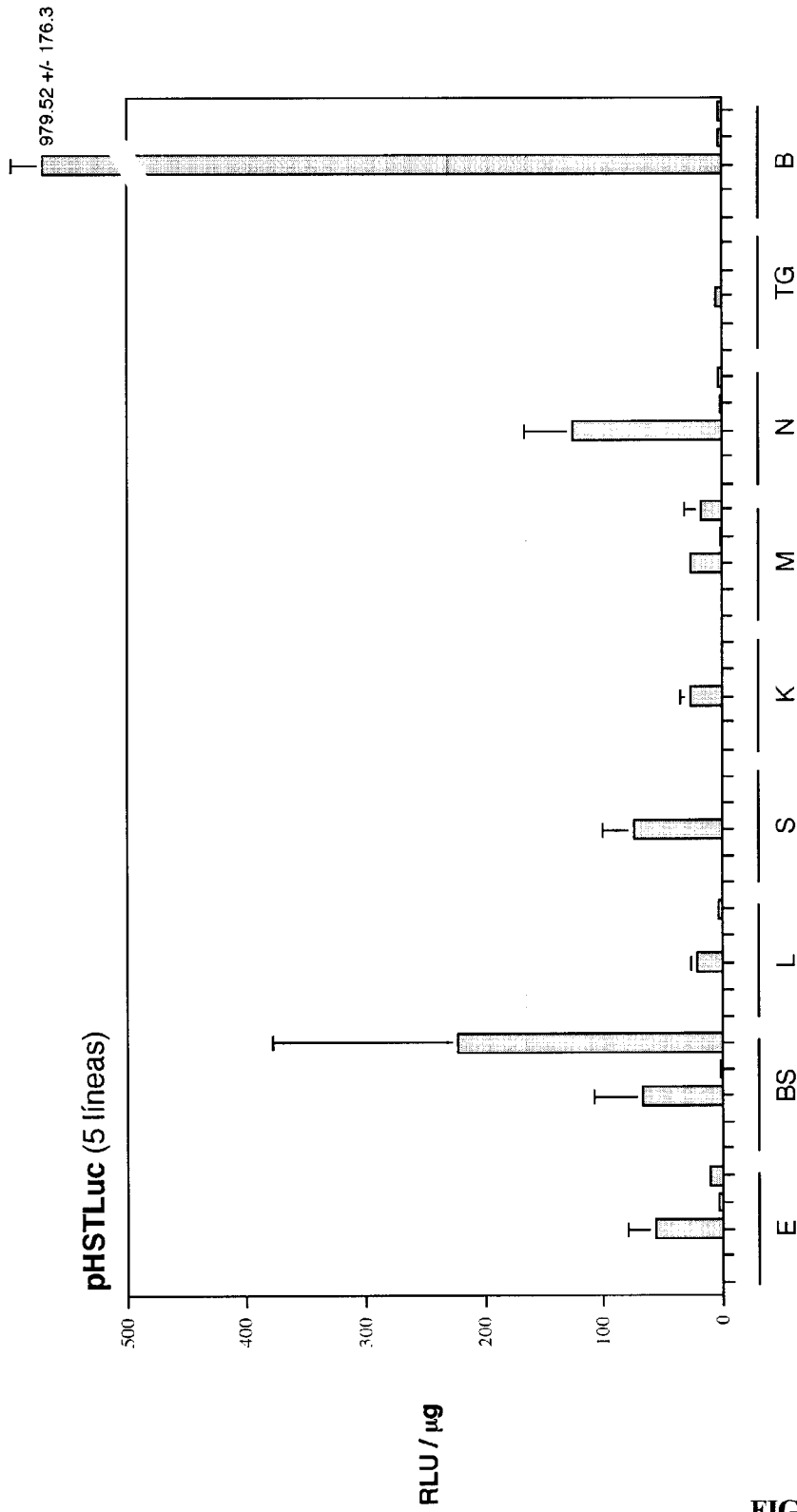


FIGURA 5B

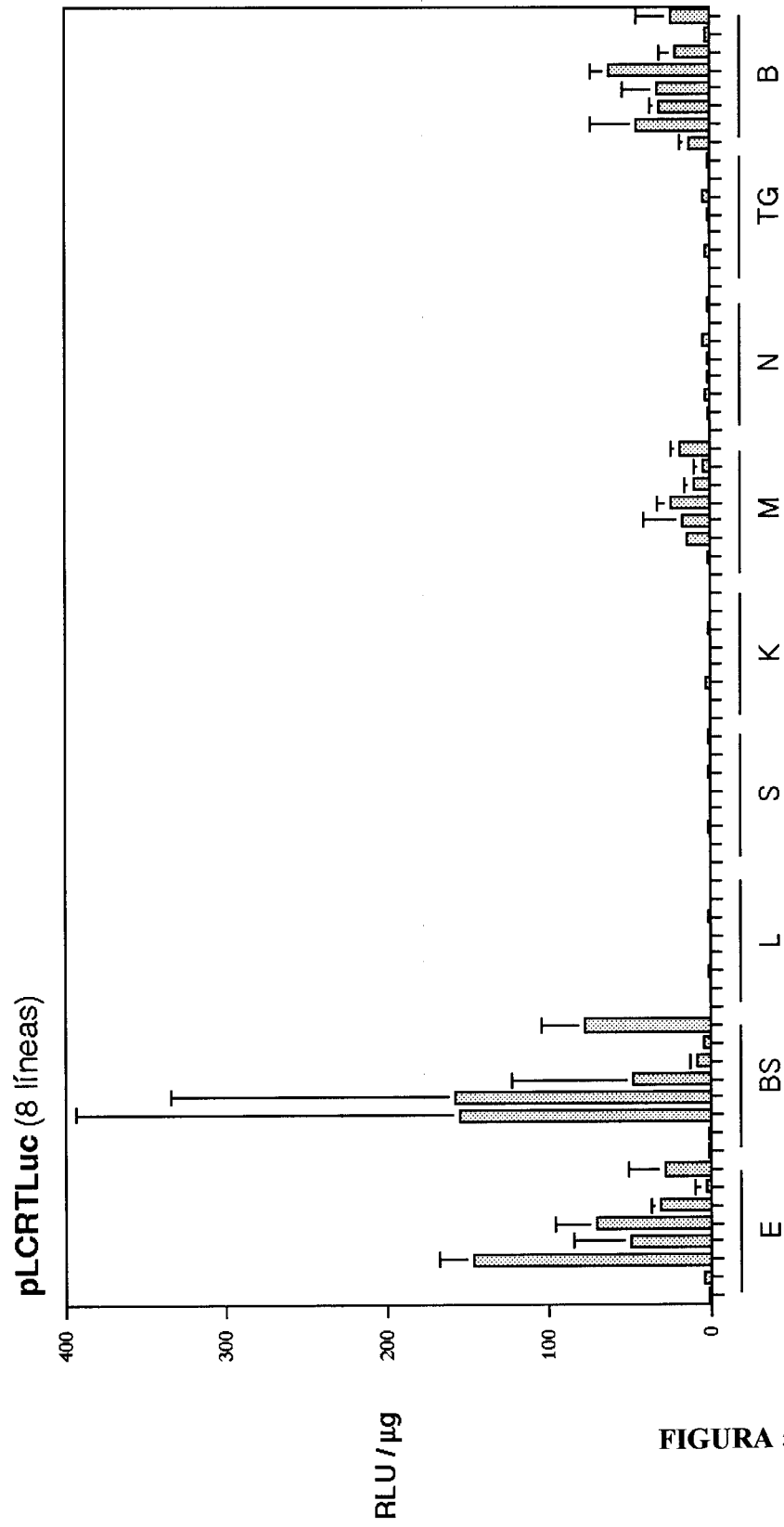


FIGURA 5C

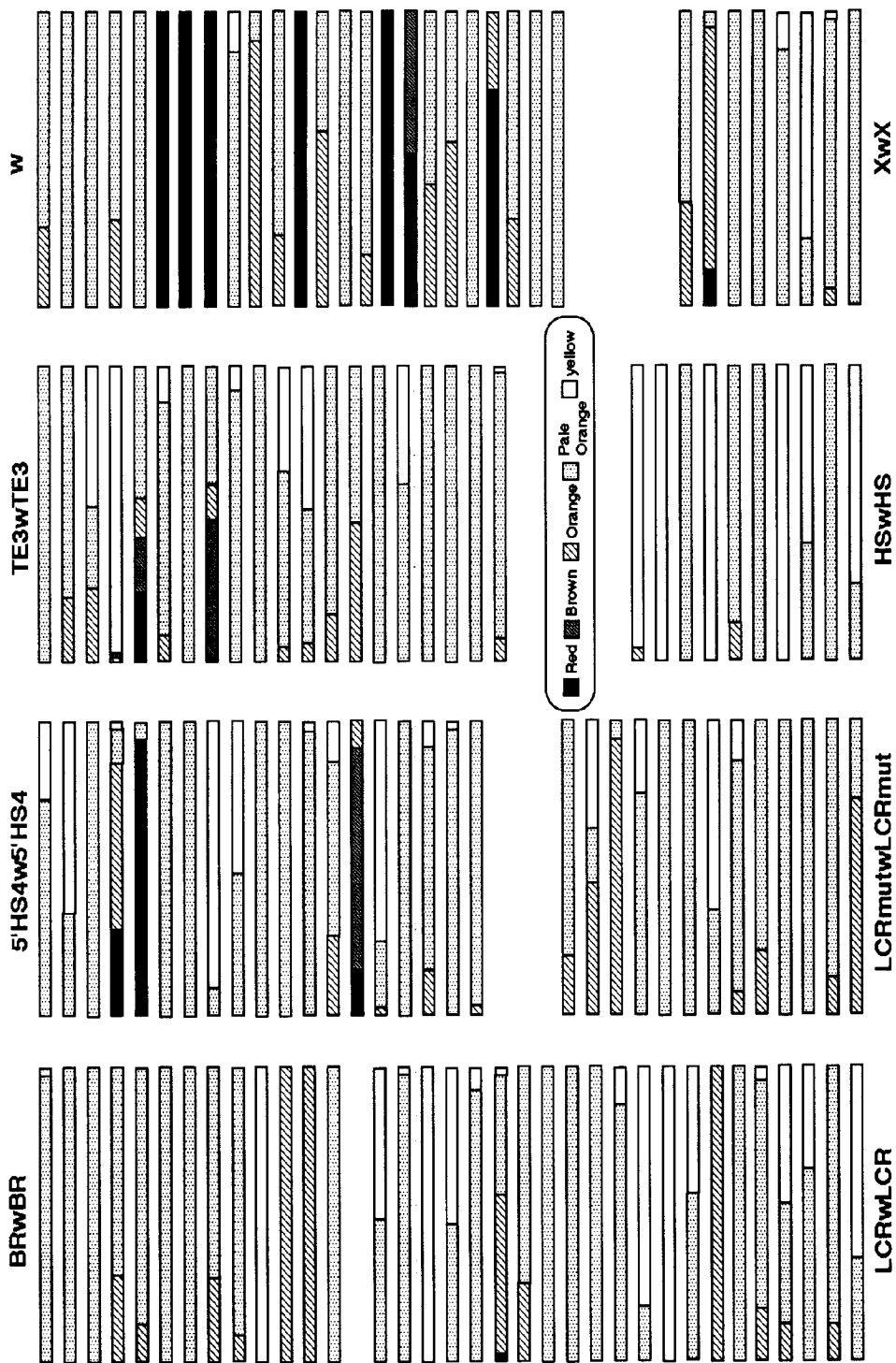


FIGURA 6

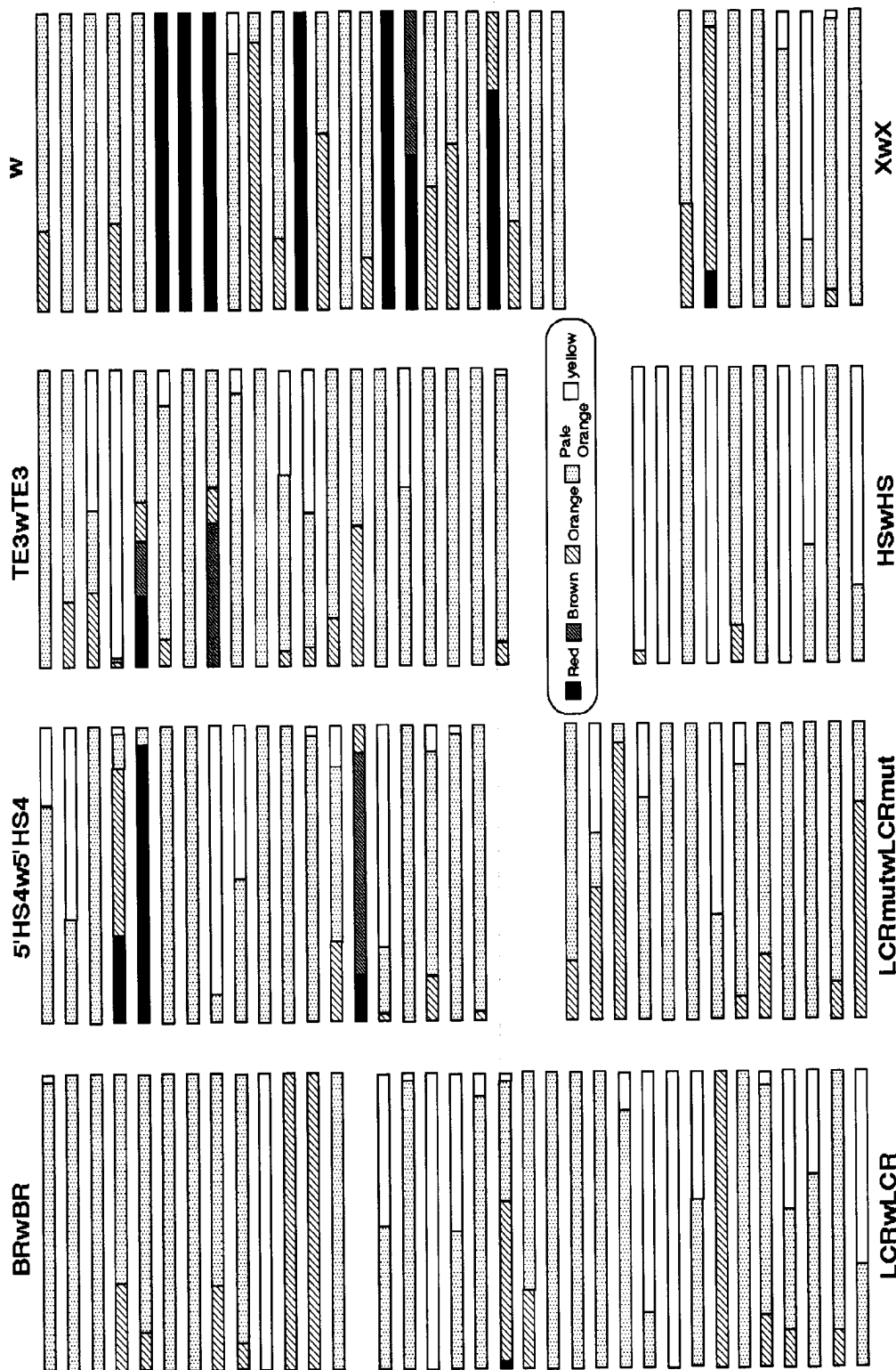


FIGURA 7

ES 2 178 608 B1

LISTAS DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas

5 <120> Molécula de ADN con actividad aisladora de efectos de posición cromosomales en procesos de transferencia génica en células de animales

<160> 1

10 <170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 3.711

15 <212> ADN

<213> Ratón

20 <400> 1

gaattctgtc ctaaacacgt ctttgggctt tctttggggg gccggggggg atttgagtc 60
ttttaatgat tgcttttatt ttcttatata ttacaggctt atttaaattg ttaatgat 120
25 tttcatttaa ctttgtaag tgatacctat caagaaaatt gtcattcca attttatgaa 180
gtacaggttt ttgacatatg tgctagtaac tttctgtgtt tccttggtgt ctgctgttat 240
30 gttccctttt ggtttcagggt tttattgatt gggatagtct ctcagtgtct tttagttatt 300
tttgaataag agtttttcta ccttggtgat gttctcaaat aacctactct ttgtttcatt 360
gttaatgtgc attcctttgt ttctatttta ttggttcag gcatgagttt gattatttcc 420
35 tactttttac tcctcttggg tgtggttgtt tctttttgct ctagggattt tagctgtgct 480
attaagttgt tagtatgaga tgtctttaat ttctttaca agacacttag tgctaagcac 540
40 ttttctcgta acaccacttt aactgtgttt gggatatatct tgcatcctt tcattgaaa 600
tctggagagt cttttatttc tttctttatt tctgccttga cctcaaagtc atccagtagg 660
gagttgtgca gctttcatga gttttaggtt tttctgtgtt tgaatcccac ctttactcca 720
45 tgttgctctaa taagacacaa ggcattattt caactttctt atatctgttg aggcttattt 780
tgtgaacaac tatatgatca attttgaga aagtttaagg attgctgaga gaaaggtgcc 840
50 ttcttttttt gtttgggtga aatgttctaa aaaatatata ttaggtcttt tacctcatt 900
atctcttagt ttagtttttg tctagatgac atgtctattc atgagagtag gatattgaag 960
tctcccacta ttaatgtatt agattcaatt tgtgatttga gcattagtaa tgtttcactt 1020
55 ccaaagtgtg tacccttgct ttggggacat agatgttaag aactgaagtg ttatcatggc 1080
taatttttcc tttgatgagt atgaaatgct atttccatc tctattgact aattttcttg 1140
60 taaagtgtga tttgctagat attagaatag ctaaacacgc ttgcttcttg agtgcacttg 1200
cttggaaat ttttttcaa cccttaactg gaggtattgt ctatcttgat gttgaggtct 1260

ES 2 178 608 B1

atTTTTgtA ctCagtGaaa tGattgattc tctTTTTgca tccactctgt ttgcctgtgt 1320
gttttattga gtaattgagt ccatttactt tgagaaatat taatgatcaa tgattcttca 1380
5 tttctgttat tttggTggTg gtggTgatag tagtgatagt tgtgtgcatg tgtatgtgtg 1440
tgtgtgatg tgggtgtgtt tgatttttct ctgtatcatg attgcctata tgcaaaactg 1500
taaataTTTT tcattaatac actagaattt gtgtttaaat gatatacaga ctaatctata 1560
10 ccaaatgtgt tattacagat tttctagact aaatgactca tcaatcctct gttagattta 1620
aatTTTgggt aactctttta tatatgtatc ctttataatg gatttagaag tttgaatccc 1680
15 atcaaaaaga cagtacatat atattgtatg gaagaatc aaagtttTgt agtgataaaa 1740
ctaggcaatt ttggcctaga gctttgcagt gatgattagt agcaagagtt tggttgtagt 1800
aatatgttat cacactgtct ctctgaaatg atatttctct aaatattcac ttctagcaat 1860
20 catgttcatt tgtttacatg aaccaccaa cctaaacatg aactacaaa tgtatgaact 1920
ttcaccaca gtgttatttt ctcatggctc ttgtccttg ttcaaattc aaccagttga 1980
25 aataatggca gtattttgta aattctgtac atTTTTttc tctgttcct atacttgaca 2040
aaaatttccc tttttcaca ttctctatt tacactgttc tttttcatg gtaagaaga 2100
gtcagtatga ccctcaagc agtgttctc aacaatctg tctcttaggc tcatttatag 2160
30 agggaatgag ctatgtctcc acaatacctc aatattactt gagaataaat tccaacatat 2220
agacctggtA ataagccata agtacctgt tccattgata agtgttcact tggaccatc 2280
35 agttactatt ccatacatct tcactttctg aacctcatt atgtttgaaa attcaagatt 2340
agaataacta tttaatggag gttatttaca aagatgcatt atgtggcatt tgtggaaga 2400
atcatttctgT gggTccaca atccattgca tcattccttg aagtggttta agtcttttga 2460
40 ttgtcattgt taataactgc attaaaagat tccttcattc cctgatttga gcttgacttt 2520
actcacagct agaaaattag aggcagaagg agagtgaagt caaaggctg caactcctc 2580
45 tttgccacat aacaagaaag ttgcttatat ctttctcaa ggtcatagtt cctgccagct 2640
gactttgtca agacagtgat gtctgtgttc cagcagttgt tctgagtatc cttttcatta 2700
tccactgtcc tttcttctta aattccacc ccaacattgt aaatagctt tttcttaaac 2760
50 tctgttcaaa gaaccagctt gagtgtgtca gctgcttct gctgggtcc tggcaacca 2820
caatattatt aacaatatgt acccaataaa gagtctgaa attgccacac catcacctt 2880
55 taatattcct attcagattg tgaacttcta caaagcagga atgtggctt tttattttcc 2940
tgttatcttg cactgtcaca cttattctt gggaaaataa aaacacaaa tatgcattc 3000
tttggTctac tgaatgaaga tggaaTgtg attactctga ctctttaaT gtaaTggTg 3060
60 cttcatattc ctctaaagcc ttaagcaca taacacaggg tgggtggtaa gaaaatatct 3120

ES 2 178 608 B1

gtagtatgga tacaaatttg ttccataaga atataagtat aaaattatta aataaaatgt 3180
ttcaggaaaa tttaaactgg aacaaatcaa ggtaagtatc atctaaaaat gagcttaggt 3240
5 agacatggtg agttgagctt ctagggaagc tgtaagagt aattatttag aaaaaagta 3300
ggtcaagaag aaaacactaa atagattatt cagataaaca ttttatttca aatagtattt 3360
tcatagaaca ttttgagggc atctgtttgg aaagaaattg attattgcat tagctctgag 3420
10 attcacatct ttcttgttta tataagagct cttttaaata tgtgttttat gatactgtct 3480
cttgttgaat gttgcagtct ctctccaat tcagacatct ccaagggtca ggaagcaaca 3540
15 tgagcaattc agtgaaagat agtatatttc caatgtctaa ccaaaaattg tagattctga 3600
tgaaagcctg gttgtgtgat gagacacaca gagagagaat cagacttgga aaatggctgc 3660
acagctacaa atacttcaa tacttgctat caagcttaac ggcatgaatt c 3711
20

25

30

35

40

45

50

55

60



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 178 608

② Nº de solicitud: 200101133

③ Fecha de presentación de la solicitud: 18.05.2001

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12N 15/12, 15/85, 5/16, 15/89, A01K 67/027

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MONTOLIU et al. . ^A locus control region at-12 Kb of the tyrosinase gene". 1996. The EMBO Journal, Vol. 15 (22). Páginas 6026-6034.	1-15
A	PORTER S. et al. "Distal upstream tyrosinase S/MAR - containing sequence has regulatory properties specific to subsets of melanocytes". 1999. Developmental Genetics, Vol. 25 (1). Páginas 40-48.	1-15
A	PORTER S. et al. . ^A distal tyrosinase upstream element stimulates gene expression in neural-crest-derived melanocytes of transgenic mice: position-independent and mosaic expression". 1994. Development, Vol. 120. Páginas 2103-2111.	1-15
A	GANSS R. et al. . ^A cell-specific enhancer far upstream of the mouse tyrosinase gene confers high level and copy number-related expression in transgenic mice". 1994. The EMBO Journal, Vol. 13. Páginas 3083-3093.	1-15

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 01.09.2002	Examinador A. Collados Martín Posadillo	Página 1/1
---	---	----------------------