



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 753**

51 Int. Cl.:

**C07H 21/02** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12P 19/34** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03707861 .5**

96 Fecha de presentación : **13.02.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1483281**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.12.2004**

54

Título: **Procedimiento para producir moléculas de ARN de interferencia en células de mamífero y usos terapéuticos para tales moléculas.**

30

Prioridad: **14.02.2002 US 356127 P**

73

Titular/es: **City of Hope  
1500 East Duarte Road  
Duarte, California 91010, US**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2009**

72

Inventor/es: **Rossi, John, J. y  
Lee, Nan-Sook**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2009**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 312 753 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir moléculas de ARN de interferencia en células de mamífero y usos terapéuticos para tales moléculas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la interferencia de ARN. Más particularmente, la presente invención se refiere a procedimientos para producir moléculas de ARN de interferencia en células de mamífero, con la excepción de células madre embrionarias humanas o células germinales humanas, y a los usos terapéuticos para tales moléculas expresadas.

15 **Antecedentes de la invención**

La interferencia de ARN es el proceso de silenciamiento génico postranscripcional, específico de secuencia, en animales y plantas iniciado por ARN bicatenario (bc) que es homólogo al gen silenciado (Hammond, S.M. *et al.*, 2000; Fire, A., 1999; Sharp, P.A., 2001). En particular, se sabe que ARNip sintéticos y endógenos dirigen la degradación de ARNm seleccionado como diana (Hammond, S.M. *et al.*, 2000; Elbashir, S.M. *et al.*, 2001; Caplen, N.J. *et al.*, 2001; Clemens, J.C. *et al.*, 2000; Lipardi, C. *et al.*, 2001; Elbashir, S.M. *et al.*, 2001; Ui-Tei, K. *et al.*, 2000).

Esta potente tecnología genética ha implicado habitualmente la inyección o transfección de ARN bc en organismos modelo. La interferencia de ARN también es un potente inhibidor de la expresión del gen seleccionado como diana en una variedad de organismos (Wianny, F. *et al.*, 2000; Kennerdell, J.R. *et al.*, 1998; Fire, A. *et al.*, 1998; Oelgeschlager, M. *et al.*, 2000; Svoboda, P. *et al.*, 2000). Recientes estudios por varios grupos (Lipardi, C. *et al.*, 2001; Sijen, T. *et al.*, 2001) sugieren que todos los ARN de interferencia pequeños bc (ARNip) son parte de un complejo de riboproteína que incluye una nucleasa relacionada con la ARNasa III (Dicer) (Bernstein, E. *et al.*, 2001), una familia de helicasas (Dalmay, T. *et al.*, 2001; Cogoni, C. *et al.*, 1999) y posiblemente una quinasa (Nykanen, A. *et al.*, 2001) y una RdRP (Lipardi, C. *et al.*, 2001; Smardon, A. *et al.*, 2000). El mecanismo propuesto por Lipardi *et al.* (Lipardi, C. *et al.*, 2001) es que uno de los oligómeros de ARNip (antisentido con respecto al ARN diana) ceba una RdRP, generando ARNbc más largos, que entonces se escinden mediante la actividad ARNasa III en dúplex de ARNip adicionales, modificando de ese modo los ARNip del molde diana.

El ARNbc  $\geq 30$  pb puede desencadenar en células de mamífero respuestas de interferón que son intrínsecamente no específicas de secuencia (Elbashir, S.M. *et al.*, 2001). Sin embargo, los dúplex de ARNip de 21 nucleótidos (nt) con proyecciones cortas en 3' pueden mediar la interferencia de ARN de una manera específica de secuencia en células de mamífero cultivadas (Elbashir, S.M. *et al.*, 2001). Dos grupos han demostrado que dúplex de 19 a 21 bases con proyecciones UU o TT en 3' pueden provocar eficazmente una respuesta de ARNip en células de mamífero (Elbashir, S.M. *et al.*, 2001; Caplen, N.J. *et al.*, 2001). Sin embargo, una limitación al uso de ARNip como reactivo terapéutico en células de vertebrados es que necesita suministrarse ARN sumamente definido, corto, a células dianas, que hasta la fecha se ha logrado sólo usando ARN en dúplex sintéticos suministrados de manera exógena a las células (Elbashir, S.M. *et al.*, 2001; Caplen, N.J. *et al.*, 2001).

La presente invención supera al menos la limitación anterior.

45 **Sumario de la invención**

La presente invención implica procedimientos para producir moléculas de ARN de interferencia, bicatenario en células de mamífero, y preferiblemente células humanas, introduciendo en las células secuencias de ADN que codifican las moléculas de ARN de interferencia.

El procedimiento comprende a) insertar secuencias de ADN que codifican una cadena sentido y una cadena antisentido de una molécula de ARN de interferencia en un vector que comprende un promotor de ARN pol III y b) introducir el vector en una célula de mamífero de modo que puede expresarse la molécula de ARN.

En una realización preferida, la presente invención incluye seleccionar en primer lugar una secuencia diana, que preferiblemente es accesible para el apareamiento entre la secuencia diana y el ARN de interferencia requerido para que el ARN de interferencia funcione de manera apropiada. Pueden llevarse a cabo procedimientos para identificar sitios diana usando oligonucleótidos de ADN sintéticos en extractos celulares y/o un enfoque de selección de sitio sobre ARN nativo, tal como se describe en el presente documento. Una vez identificado un sitio diana óptimo, pueden sintetizarse las secuencias apropiadas para preparar las cadenas sentido y antisentido de la molécula de ARN de interferencia.

Los sitios diana posibles incluyen los encontrados en productos de transcripción de genes de agentes infecciosos o celulares (virales, bacterianos, etc.).

En una realización preferida, la molécula de ARN producida es una molécula de ARN de interferencia pequeño (ARNip), mientras que las secuencias de ADN que codifican las cadenas sentido y antisentido del ARNip son ADNip.

## ES 2 312 753 T3

En una realización preferida, el promotor de ARN pol III es un promotor de U6 de mamífero, y más preferiblemente el promotor de ARN pol III U6 humano.

Según un aspecto, la presente invención proporciona uno o más vectores que comprenden (i) un primer casete que comprende un promotor de ARN pol III, operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica la cadena sentido de una molécula de ARN de interferencia bicatenario, pequeño (ARNip) para su uso en terapia y (ii) un segundo casete que comprende un promotor de ARN pol III operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica la cadena antisentido de la molécula de ARNip, en los que el primer casete y el segundo casete están en el mismo vector o están en vectores separados y en los que cuando el uno o más vectores se introducen en una célula de mamífero la molécula de ARNip puede expresarse e iniciar la interferencia de ARN de la expresión de un gen diana en la célula de mamífero, inhibiendo de ese modo la expresión del gen diana.

Según otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de uno o más vectores para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del VIH, en el que el uno o más vectores comprenden (i) un primer casete que comprende un promotor de ARN pol III operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica la cadena sentido de una molécula de ARN de interferencia bicatenario, pequeño (ARNip) y (ii) un segundo casete que comprende un promotor de ARN pol III operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica la cadena antisentido de la molécula de ARNip, en los que el primer casete y el segundo casete están en el mismo vector o están en vectores separados y en los que cuando el uno o más vectores se introducen en una célula de mamífero la molécula de ARNip puede expresarse e iniciar la interferencia de ARN de la expresión de un gen diana de VIH en la célula de mamífero, inhibiendo de ese modo la expresión del gen diana de VIH.

Según un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento *in vitro* para someter a prueba la expresión y función de moléculas de ARNip, que comprende: cointroducir en una célula de mamífero *in vitro* (a) uno o más vectores que comprenden (i) un primer casete que comprende un promotor de ARN pol III operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica la cadena sentido de una molécula de ARN de interferencia bicatenario, pequeño (ARNip) y (ii) un segundo casete que comprende un promotor de ARN pol III operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica la cadena antisentido de la molécula de ARNip, en los que el primer casete y el segundo casete están en el mismo vector o están en vectores separados y (b) un vector que comprende un promotor que comprende un promotor operativamente unido a un gen diana, hacer crecer la célula en condiciones en las que se expresa la molécula de ARNip y someterla a prueba para determinar la iniciación de la interferencia de ARN de la expresión del gen diana, mediante lo cual se somete a prueba la función de la molécula de ARNip. Según este aspecto de la invención, la función y expresión endógena de la molécula de ARNip puede someterse a ensayo basándose en la presencia, si es el caso, de interferencia de ARN y más particularmente mediante cualquier inhibición de la expresión del gen diana.

Por tanto, la presente invención proporciona muchas posibles aplicaciones terapéuticas, basándose en el diseño de las moléculas de ARNip y su especificidad para dianas de enfermedad seleccionadas. Por ejemplo, una aplicación de la invención es el tratamiento del VIH, para el que pueden diseñarse moléculas de ARNip para inhibir la expresión de dianas de VIH seleccionadas, inhibiendo de ese modo la expresión de VIH.

En una realización preferida, la invención implica inhibir la expresión de un gen diana de VIH introduciendo uno o más vectores en una célula de mamífero, preferiblemente una célula humana infectada por VIH. El uno o más vectores comprenden un promotor adecuado y secuencias de ADN que codifican una cadena sentido y una cadena antisentido de una molécula de ARNip, que preferiblemente es específica para el producto de transcripción del gen diana de VIH. Más preferiblemente, la molécula de ARNip es específica para un sitio diana seleccionado en el producto de transcripción del gen diana de VIH seleccionado. Entonces puede expresarse la molécula de ARNip e iniciarse la interferencia de ARN de la expresión del gen diana, inhibiendo de ese modo la expresión del gen diana.

En una realización más preferida, el VIH es VIH-1. En otra realización preferida, pueden expresarse múltiples constructos de ARNip dirigidos hacia diferentes sitios en el genoma de VIH, iniciando de ese modo la interferencia de ARN de la expresión de varios genes diana de VIH diferentes y sorteando así posiblemente la resistencia genética del virus.

### 55 Breve descripción de las figuras

La figura 1A muestra un diagrama esquemático de un constructo *rev*-EGFP.

La figura 1B [SEC ID N°: 9] y 1C (AS (I) [SEC ID N°: 1], S (I) [SEC ID N°: 2], AS (II) [SEC ID N°: 3], S (II) [SEC ID N°: 4]) muestran diagramas esquemáticos de un constructo de promotor de U6 y de un constructo de ARNip dirigido por el promotor de U6.

La figura 1D muestra ARNip (S (I) [SEC ID N°: 5], AS (I) [SEC ID N°: 6], S (II) [SEC ID N°: 7], AS (II) [SEC ID N°: 8] según una realización de la invención.

La figura 2 muestra fotografías de geles de los ensayos de accesibilidad para los sitios I y II en extractos celulares preparados a partir de células que expresan *rev*-EGFP.

## ES 2 312 753 T3

La figura 3 muestra fotografías obtenidas de la toma de imágenes mediante microscopio de fluorescencia del efecto de ARNip sobre la expresión de EGFP.

La figura 4 es un gráfico de barras que muestra el grado de inhibición de la expresión de EGFP por ARNip según una realización de la invención

Las figuras 5A a 5G muestran autorradiografías de análisis de geles de tipo Northern.

La figura 6 es un gráfico que muestra la inhibición de VIH-1 NL4-3 por ARNip según una realización de la invención.

### Descripción detallada de la invención

Las moléculas de ARN de interferencia, y más preferiblemente moléculas de ARNip, producidas y/o usadas según la invención incluyen los tipos conocidos en la técnica. Las moléculas de ARNip de interferencia son ARN bicatenarios (bc) que general y preferiblemente contienen aproximadamente de 19 a 23 pares de bases. Las moléculas también contienen preferiblemente proyecciones en 3', más preferiblemente proyecciones UU en 3' o TT en 3'.

El término "introducir" abarca una variedad de procedimientos de introducción de ADN en una célula, *in vitro* o bien *in vivo*, incluyendo tales procedimientos la transformación, transducción, transfección e infección. Los vectores son agentes útiles y preferidos para introducir ADN que codifica las moléculas de ARN de interferencia en las células. Los posibles vectores incluyen vectores de plásmido y vectores virales. Los vectores virales incluyen vectores retrovirales, vectores lentivirales y otros vectores tales como vectores adenovirales o vectores adenoasociados.

En una realización, las secuencias de ADN se incluyen en vectores separados, mientras que en otra realización, las secuencias de ADN se incluyen en el mismo vector. Si las secuencias de ADN se incluyen en el mismo vector, las secuencias de ADN también pueden insertarse en el mismo casete transcripcional.

También pueden usarse sistemas de suministro alternativos para introducir ADN en las células en la presente invención, incluyendo, por ejemplo, liposomas, así como otros sistemas de suministro conocidos en la técnica.

El promotor usado según la invención es un promotor de ARN pol III, que se ubica preferiblemente inmediatamente en sentido 5' de las secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN de interferencia.

En una realización preferida, la invención usa un promotor de ARN pol III U6 de mamífero, y más preferiblemente el promotor de ARNsn pol III U6 humano, que se ha usado anteriormente para la expresión de transcritos de ribozima cortos definidos, en células humanas (Bertrand, E. *et al.*, 1997; Good, P.D. *et al.*, 1997). Se encontró que la pol III de U6 y su secuencia de terminación sencilla (de cuatro a seis uridinas) expresan ARNip en células. Pueden insertarse secuencias que codifican ARN de interferencia o ARNip seleccionadas apropiadamente en un casete transcripcional, proporcionando un sistema óptimo para someter a prueba la función y expresión endógena de las moléculas de ARN.

En una realización preferida, las células de mamífero son células humanas, con la excepción de células madre embrionarias humanas o células germinales humanas. Sin embargo, también se entiende que la invención puede llevarse a cabo en otras células diana, tales como otros tipos de células de vertebrados o células eucariotas.

Según la invención, se demostró la expresión eficaz de dúplex de ARNip dirigidos contra la secuencia *rev* de VIH-1. Usando un constructo de fusión *rev*-EGFP (proteína fluorescente verde potenciada) en ensayos de cotransfección transitoria, se observó aproximadamente un 90% de inhibición de la expresión. Se han sometido a prueba los mismos constructos de expresión de ARNip contra VIH en ensayos de cotransfección dando como resultado una reducción de cuatro log en los niveles de antígeno p24 de VIH.

Los resultados anteriores se lograron usando un promotor de ARNsn pol III de U6 humano para expresar los ARN de oligómero de 21 bases apropiados en células humanas. El diseño del promotor es tal que la primera base del transcrito es la primera base del ARNip, y el transcrito termina dentro de un tramo de 6 U codificado en el gen. El promotor de U6+1 inicia la transcripción con un trifosfato, y el transcrito no está tapado a menos que se incluyan las primeras 27 bases del ARN de U6 en el transcrito (Bertrand, E. *et al.*, 1997; Good, P.D. *et al.*, 1997). Por tanto, se creía que podían prepararse ARNip cuya estructura imitase estrechamente ciertos requisitos predefinidos (Elbashir, S.M. *et al.*, 2001; Caplen, N.J. *et al.*, 2001).

Tal como se indicó anteriormente, se diseñan casetes de expresión de modo que las secuencias que codifican cadenas sentido y antisentido del ARNip pueden estar en el mismo vector o bien en vectores separados. Aunque se pronosticó que el vector que contenía ambas cadenas sentido y antisentido era superior para la cotransfección de las dos por separado, este no fue el caso. Es probable que la cotransfección yuxtaponga las dos secuencias de modo que los transcritos tengan una amplia oportunidad de formar ARNbc. Una característica interesante del sistema de expresión es que en células que expresan ambos oligómeros de ARN sentido y antisentido, se acumula un producto dimensionado de manera anómala inesperado en grandes cantidades (figuras 5A-D). Los experimentos con pretratamiento con ARNasa de los ARN antes de la electroforesis e inmunotransferencia sugieren que este transcrito mayor es bicatenario. El ARN

bc puede estar en forma de un dúplex sencillo, o podría estar unido covalentemente. Se ha mostrado que los ARNip unidos covalentemente son eficaces cuando se expresan en células, un resultado algo contradictorio con los resultados cuando se usa ARNip suministrado *ex vivo* (Elbashir, S.M. *et al.*, 2001; Caplen, N.J. *et al.*, 2001).

5 Con el fin de establecer si hay diferencias o no en las accesibilidades al sitio diana para el apareamiento de ARNip tal como se observó para ribozimas y oligos antisentido (Scherr, M. *et al.*, 1998; Scherr, M. *et al.*, 2001; patente estadounidense número 6.562.570), se sometieron a prueba dos sitios diana para los ARNip. Se eligió un sitio mediante un mecanismo de exploración de biblioteca de oligonucleótidos diseñado para identificar sitios accesibles para el apareamiento antisentido en ARN nativo en extractos celulares (Scherr, M. *et al.*, 2001), mientras que el otro sitio se eligió al azar en un segmento de *rev* que se solapa con la secuencia *tat* de VIH-1. Las marcadas diferencias en la accesibilidad para el apareamiento de oligos en estos dos sitios se tradujeron en marcadas diferencias en las actividades inhibitoras de ARNip en la fusión *rev*-EGFP. A pesar de las diferencias en la potencia contra la diana *rev*-EGFP, ambos ARNip fueron potentes inhibidores en ensayos de cotransfección con VIH-1. Por tanto, la invención demuestra la expresión intracelular funcional de ARNip en células de mamífero, particularmente célula humanas.

15 Un resultado interesante era la relación entre la accesibilidad al sitio de oligómeros de ADN antisentido y la eficacia de los ARNip dirigidos contra el transcrito *rev*-EGFP. Más específicamente, se observó una relativa carencia de inhibición de la diana *rev*-EGFP mediada por ARNip de sitio I. Este resultado no era el resultado de la escasa expresión de estos oligómeros, dado que parecen expresarse en cantidades equivalentes a ARNip de sitio II (figuras 20 5A-D). Estos resultados diferentes podrían deberse a la posición del sitio diana de ARNip en relación con el extremo del transcrito diana, que se ha demostrado que limita la amplificación de los ARNip en *Drosophila* (Elbashir, S.M. *et al.*, 2001). Sin embargo, este no parece ser el caso dado que el sitio I está colocado a 301 nucleótidos en sentido 3' del sitio de inicio transcripcional de pIND-*rev*-EGFP, que es bastante más de la distancia mínima requerida para amplificar los ARNip. Estos resultados podrían deberse a diferentes dianas usadas en diferentes experimentos. La accesibilidad 25 relativa del sitio I en el contexto del ARNm de fusión de *rev*-EGFP puede ser limitativa tal como se muestra mediante experimentos de oligo-ARNasaH (figura 2). En los transcritos de VIH-1, el sitio I está presente en ambos transcritos *tat* y *rev*, así como en los transcritos no cortados y empalmados, y cortados y empalmados individualmente. Dada la complejidad de los diferentes transcritos que albergan el sitio I, no es posible establecer cuál de estos es sensible a los ARNip de sitio I.

30 *ARNm diana para someter a prueba ARNip.* Un requisito previo para el desarrollo de enfoques de ARNip para silenciar la expresión génica viral es tener un sistema de ensayo de células humanas apropiado. Con el fin de someter a ensayo los ARNip, se fusionó *rev* con EGFP (proteína fluorescente verde potenciada) para proporcionar un sistema indicador para controlar la función de ARNip (figura 1A). Se obtuvo el control temporal de la expresión de ARNm diana insertando el gen de la fusión de *rev*-EGFP en el sistema de vector pIND inducible por ecdisona (Invitrogen) (figura 1A). Resultará fácilmente evidente para los expertos en la técnica que pueden usarse promotores y sistemas de vector 35 alternativos para expresar genes de fusión diana o genes diana seleccionados, durante los ensayos de cotransfección.

40 Con el fin de usar el sistema inducible, se usó una línea celular 293/EcR, que se modificó genéticamente para responder al análogo de hormona de insectos ponasterona A. Cuando se transfectó el vector pIND-*rev*-EGFP en estas células seguido por la adición del inductor, se observó fluorescencia de EGFP en tan sólo 3 h tras la adición de ponasterona A y continuó durante más de 100 h. En ausencia de ponasterona A, no se observó fluorescencia de EGFP.

45 En la figura 1A, se indican las ubicaciones relativas de los dos sitios diana de ARNip en la diana *rev*-EGFP, así como las ubicaciones de estos dos sitios diana en transcritos de VIH a partir de pNL4-3.

*Accesibilidad al sitio diana en el transcrito de la fusión rev-EGFP.* Se demostró previamente que pueden usarse oligonucleótidos de ADN sintéticos en extractos de células u ovarios para identificar sitios accesibles para el apareamiento de bases por ambos ADN antisentido y ribozimas (Scherr, M. *et al.*, 1998; Scherr, M. *et al.*, 2001; Lee, N.S. *et al.*, 2001). Se usaron bibliotecas de oligómeros de ADN de 19-mero semialeatorias (Scherr, M. *et al.*, 2001) en extractos celulares preparados a partir de células que expresan los transcritos de ARNm de *rev*-EGFP. Usando este enfoque para explorar la secuencia *rev* entera, sólo se identificó un único producto de TdPCR (datos no mostrados), que se centraba dentro de la secuencia 5'GCCTGTGCCTCTTCAGCTACC 3' [SEC ID N°:10], ubicada a 213 nucleótidos en sentido 3' del codón AUG de *rev* y a 494 nucleótidos en sentido 3' del sitio de iniciación de la transcripción de pIND. 55 Dado que esta secuencia alberga un motivo de rotura de ribozima de cabeza de martillo CUC, también se sintetizó una ribozima de cabeza de martillo que rompe tras el sitio CUC. Esto permitió una comparación entre la actividad inhibitora del ARNip con una ribozima expresada a partir del mismo sistema de promotor. Para determinar si hay o no diferencias en el transporte dirigido mediado por ARNip de un mensaje dado, se seleccionó un segundo sitio de 21 nucleótidos con una G en 5' y una C en 3', que tiene un contenido en GC total similar al sitio I. Los requisitos de una G 60 en 5' y una C en 3' se basan en el primer nucleótido del transcrito pTZU6+1, que se inicia con una G (figuras 1C y D). La segunda secuencia diana, 5'GCGGAGACAGCGACGAAGAGC3' [SEC ID N°:11], también se ubica en un exón común a *tat* y *rev*, a 20 nucleótidos en sentido 3' del codón de iniciación transcripcional de *rev* y a 301 nucleótidos en sentido 3' de la señal de iniciación transcripcional de pIND.

65 En la figura 1B, se muestra la presentación esquemática del promotor en sentido 5' y se muestra la parte de transcrito del casete de expresión de U6 con las secuencias y la estructura representada del transcrito primario esperado. En la figura 1C se muestran las secuencias de los insertos sentido y antisentido de 21 bases con una sucesión de 6T y XbaI. La primera G provino del *SalI* tratado con Mung Bean del vector pTZU6+1. Los 6T pueden procesarse en

## ES 2 312 753 T3

los 2T (letras mayúsculas) mediante la polimerasa ARN pol III. En la figura 1D, se representan los ARNip supuestos derivados de la expresión conjunta de los 21-meros antisentido y sentido [S/AS (I) o (II)], con proyecciones UU en 3'.

5 Para determinar si las dos secuencias diana eran igualmente accesibles para el apareamiento antisentido, se sintetizaron oligonucleótidos de ADN de 21-mero complementarios a cada uno de los dos sitios diana de ARNip y se usaron como sondas para determinar la accesibilidad para el apareamiento de bases con los transcritos de la fusión *rev*-EGFP en extractos celulares. Se demostró (figura 2) que el sitio II es sumamente accesible para el apareamiento de bases con su oligo relacionado (reducción del 89% en el producto de RT-PCR en relación con el control sin oligo). Esto era al contrario que los resultados obtenidos con el oligo de sitio I, que redujo el transcrito de *rev*-EGFP en un 27% en relación con el control. Dado que estos dos sitios tienen marcadas diferencias en sus accesibilidades para el apareamiento antisentido (figura 2), proporcionaron una buena prueba del papel que desempeña la accesibilidad a la diana en el transporte dirigido mediado por ARNip.

15 En la figura 2, las bandas teñidas con bromuro de etidio representan productos de RT-PCR de ARNm de *rev*-EGFP (parte superior, 673 nucleótidos) o actina beta (parte inferior, 348 nucleótidos). Los carriles desde la izquierda hasta la derecha son: control, sin oligo añadido, menos (-) o más (+) RT; sondas de oligonucleótidos para el sitio I (-) o (+) RT, sondas de oligonucleótidos para el sitio II (-) o (+) RT. La reducción en el ARNm diana está provocada por la actividad ARNasa H endógena tal como se describió anteriormente (Scherr, M. *et al.*, 1998).

20 Se insertaron genes que codifican ARNip dirigidos al sitio I o II detrás del promotor de ARNsn pol III U6 de pTZU6+1 (figuras 1B y C). Se construyeron los casetes transcripcionales de modo que están en el mismo vector o bien en vectores diferentes. Los constructos en vectores separados proporcionaron un conjunto de controles sentido y antisentido.

25 *Reducción de la expresión del gen diana.* Las secuencias de ARNip, junto con controles sentido, antisentido y de ribozima se cotransfectaron con el plásmido que expresa la diana *rev*-EGFP en células 293/EcR. De dieciséis a veinticuatro horas más tarde, se añadió el inductor ponasterona A a los cultivos celulares dando como resultado la inducción del producto de fusión *rev*-EGFP. Se incubaron las células durante 48 horas adicionales antes de los análisis microscópicos de fluorescencia y la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Los oligómeros de ARN sentido y antisentido combinados dirigidos al sitio II en la secuencia *rev* redujeron la señal de EGFP en aproximadamente un 90% en relación con los controles, mientras que los oligómeros de ARN sentido y antisentido combinados dirigidos contra el sitio I dieron sólo una modesta reducción en la fluorescencia (figuras 3 y 4). La inhibición mediada por los ARNip de sitio I era similar independientemente de si se expresaban ambos oligómeros de ARN sentido y antisentido a partir del mismo plásmido o estructuras principales de plásmido diferentes (véanse las figuras 1B y C). Los constructos de control, que incluían sentido solo, antisentido solo o una ribozima dirigida al sitio II, expresados cada uno a partir del promotor de U6, no dieron una reducción significativa de la expresión de EGFP en relación con el control de estructura principal de vector (figuras 3 y 4).

40 En la figura 3, se cotransfectaron células 293/EcR con pIND-*rev*-EGFP y diversos constructos de ARNip tal como se indica. Se examinaron las células microscópicamente para detectar la expresión de EGFP tras la adición de ponasterona A tal como se describe en el presente documento. El panel E muestra células fluorescentes tras la transfección con el control que es un constructo sentido/antisentido irrelevante para el *rev*. Otros tipos de controles [S (II), AS (II), vector] eran similares (A, B, D). El panel C muestra una reducción de ~90% en las células fluorescentes cuando se transfectaron células 293/EcR con S/AS (II). Los paneles F-J son imágenes teñidas con DAPI que muestran que está presente el mismo número de células en cada campo. Se confirmó el silenciamiento específico de genes diana en al menos tres experimentos independientes.

50 En la figura 4, se cotransfectaron células 293/EcR con constructos de ARNip y pIND-*rev*-EGFP tal como se describe en el presente documento. Se analizaron las células para detectar la expresión de EGFP mediante FACS y se cuantificó el nivel de fluorescencia en relación con células transfectadas con pIND-*rev*-EGFP solo. Los datos son el promedio  $\pm$  DE de tres experimentos separados. Sólo el constructo de ARNip que contenía ambas secuencias sentido y antisentido dirigidas al sitio II accesible [S/AS (II) o S+AS (II)] mostró una reducción de aproximadamente el 90%. Se indican las diversas combinaciones de constructos de ARNip dirigidos por U6 cotransfectados por pIND-*rev*-EGFP. S/AS indica el vector con ambas secuencias de ARNip sentido y antisentido mientras que S+AS indica que las secuencias de ARNip están en vectores separados. Rbz indica la ribozima de cabeza de martillo contra el sitio II. Se confirmó el silenciamiento específico de genes diana en al menos tres experimentos independientes.

60 *Expresión de ARNip y dianas en células 293.* Se llevaron a cabo análisis de geles de tipo Northern para examinar los patrones de expresión y tamaños de los ARNip transcritos a partir del sistema de promotor de ARN pol III de U6 en células 293. Estos análisis de geles de tipo Northern demostraron una fuerte expresión de ARN sentido y antisentido tal como se controló mediante hibridación con las sondas apropiadas (figura 5).

65 En la figura 5, se prepararon muestras de ARN a partir de células 293/EcR cotransfectadas transitoriamente con pIND-*rev*-GFP y diversos constructos de ARNip tal como se indicó y se sometieron a inducción con ponasterona A tal como se describió anteriormente. Se resolvió el ARN total en un gel de acrilamida al 10%/urea 8 M para ARNip, un gel de agarosa al 1%/gel de formamida para la diana o un gel de acrilamida al 10%/urea 7M para el tratamiento con ARNasa A/T1. En las figuras 5A a 5D, se realizó la hibridación usando sondas de ADN marcado con <sup>32</sup>P para transcritos sentido y antisentido para ARNip de sitio I y sitio II. Los productos de hibridación tenían ~23

## ES 2 312 753 T3

y ~46 nucleótidos de longitud. La figura 5E muestra los resultados de la hibridación de los transcritos de ribozima (II) dirigidos al sitio II. Los ARN preparados a partir de células que expresan la rebozima para el sitio II detectaron un transcrito del tamaño esperado para el transcrito de ribozima (~75 nucleótidos). Dado que la sonda usada para detectar la ribozima es también complementaria al ARNip antisentido para el sitio II, también se hibrida con los ARN antisentido dirigidos al sitio II.

Se detectaron todos los ARN control (sentido solo, antisentido solo o ribozima) en los tamaños esperados (figuras 5A-E). Los ARN preparados a partir de células que expresan simultáneamente constructos sentido y antisentido generaron productos hibridados de los tamaños esperados para los ARN individuales cortos (~23 nucleótidos). Además de los ARN dimensionados como monómero, un producto de hibridación fuerte de aproximadamente dos veces el tamaño de los oligómeros de ARN cortos (~46 nucleótidos) era claramente visible (figuras 5A-E). Este producto se detectó sólo en ARN preparados a partir de células que expresaban ambos sentido y antisentido, y se hibridaron con ambas sondas sentido y antisentido (figuras 5A-E). Dado que el sistema de gel usado para resolver los transcritos era un gel desnaturante, parecía improbable que el producto dimensionado de manera anómala pudiese ser ARNbc. No obstante, para someter a prueba esta posibilidad, se trataron las muestras de ARN con una mezcla de ARNasa A y T1 antes de la inmunotransferencia y electroforesis en gel desnaturante. Ambas de estas ARNasas rompen preferentemente ARN monocatenarios. Por tanto, si el producto anómalo es bicatenario, debe ser totalmente resistente a la destrucción por nucleasas. Se realizaron dos tipos de análisis. El primero implicó simplemente tratar las muestras de ARN con la mezcla de ARNasas, mientras que el segundo implicó calentar las muestras hasta 95°C antes del tratamiento con ARNasas (figura 5G).

En la figura 5G, se trataron los ARN de una transfección combinada usando S/AS (I+II) con una mezcla de ARNasa A y T1. Las muestras se calentaron (+) o bien no se calentaron (-) a 90°C antes del tratamiento con ARNasas. El producto de hibridación en el carril tratado con ARNasas, pero sin calentamiento, puede tener ~21 nucleótidos de longitud. Se observó este producto con sondas para ARNip sentido o bien antisentido dirigidos al sitio II.

Los ARN totalmente en forma de dúplex deben ser resistentes a la rotura, mientras que el tratamiento térmico seguido por el enfriamiento rápida de los ARN debería separar las cadenas y hacerlas susceptibles a la rotura por ARNasas. Los resultados obtenidos (figura 5C) eran consecuentes con que el producto dimensionado de manera anómala fuese bicatenario. La muestra no calentada tratada con la mezcla de ARNasa generó un producto que migraba más rápido que los otros ARN. La especie de ARN que migraba más rápido se hibridó con ambas sondas sentido y antisentido. En cambio, la muestra que se calentó antes del tratamiento con ARNasa no dio bandas de hibridación detectable. La migración más rápida de este producto podría deberse al recorte por ARNasas de bases no apareadas del dúplex. Estos productos también podrían derivarse de la rotura por ARNasas de bucles monocatenarios, que podría separar los dos ARN, permitiendo una movilidad en gel más rápida. De manera importante, los transcritos grandes, dimensionados de manera anómala se general sólo en células que expresan ambos transcritos sentido y antisentido, y por tanto deben depender de la formación de ARNbc (Bernstein, E. *et al.*, 2001; Clemens, J.C. *et al.*, 2000). Además del producto dimensionado de manera anómala, se detectó otra banda que migraba entre el producto dimensionado de manera anómala y el ARNsn de U6 de 106 nucleótidos sólo con una sonda que es complementaria al ARNip antisentido para el sitio II. Este producto tenía ~65 nucleótidos de longitud y podría ser un producto de la primera reacción de rotura dicer en un producto extendido con ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) del ARNip antisentido (Lipardi, C. *et al.*, 2001; Sijen, T. *et al.*, 2001). Finalmente, la expresión de U6+1 de la ribozima dirigida al sitio II (figura 5E) no dio como resultado la inhibición de la expresión de *rev*-EGFP (figura 4).

Para determinar si los complejos de ARNip dirigían la degradación del ARNm de *rev*-EGFP, se llevaron a cabo análisis de hibridación de tipo Northern para examinar con sonda los transcritos de *rev*-EGFP (figura 5F). La figura 5F muestra los resultados de la hibridación de los transcritos de la fusión de *rev*-EGFP. Se examinaron con sonda ARNm de GAPDH humano y ARNsn de U6 como controles internos para cada experimento. Estos datos demostraron la destrucción selectiva del transcrito de fusión sólo en células que expresan la combinación de ARNip sentido y antisentido de sitio II. Los ARNip de sitio I, aunque se expresaban abundantemente (figuras 5A y 5B) dieron como resultado una inhibición marginal de la expresión de *rev*-EGFP (figura 4), con poca degradación del transcrito (figura 5F). La combinación de ARNip de sitios I y II dio como resultado una menor inhibición que los ARNip de sitio II solos. Se cree que esto resulta de un efecto de la dosificación porque la concentración de cada uno de los plásmidos que codifican estos ARNip era la mitad de la usada para las cotransfecciones de sitio único. De la manera más interesante, Los ARNip de sitio I eran potentes inhibidores de la replicación de VIH.

*Inhibición de VIH por ARNip expresados.* En otra realización de la invención, se construyó un sistema de expresión de ARNip para inhibir la infección por VIH-1. Con el fin de someter a prueba la actividad inhibidora potencial de los diversos constructos descritos anteriormente, se cotransfectaron cada uno de los vectores de ARNip (sitio I y II) así como los constructos control con ADN proviral de VIH-1 pNL4-3 en células 293. A los intervalos indicados en la figura 6, se tomaron muestras de sobrenadante de los cultivos celulares y se midieron los niveles de antígeno viral p24 de VIH-1. En la figura 6, se cotransfectó ADN proviral de pNL4-3 con los diversos constructos de ARNip dirigidos por U6+1 a una proporción 1:5 de ADN proviral a ADN de constructo de U6. Veinticuatro horas tras la transfección, y en los momentos indicados, se tomaron alícuotas de sobrenadante para los ensayos del antígeno p24 de VIH-1. Los diversos constructos de ARNip usados se indican en la figura 6.

Se encontró que los ARNip de sitio II ARNip inhibían fuertemente la replicación de VIH-1 en este ensayo. De manera algo inesperada, los ARNip de sitio I también inhibieron de manera potente la replicación de VIH-2 (tal como

## ES 2 312 753 T3

se mide mediante la producción de antígeno p24). La combinación de ambos constructos de ARNip de sitio I y II fue la más potente, proporcionando aproximadamente cuatro log de inhibición en relación con los constructos control. Tal inhibición potente de VIH-1 no se ha observado anteriormente con otros agentes anti-VIH-1 a base de ARN usando un ensayo de cotransfección. Las posibles explicaciones para las diferencias en la actividad inhibidora por los ARNip de sitio I contra la fusión *rev*-EGFP frente al propio VIH-1 se abordan en el presente documento. La observación de que dos dianas de VIH diferentes son ambas sustratos para ARNip es sumamente esperanzadora para estrategias que requieren un transporte dirigido múltiple para sortear la resistencia genética del virus.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no pretenden ser limitantes.

### Ejemplo 1

#### *Ensayo de accesibilidad*

Para evaluar la accesibilidad de secuencias diana para el apareamiento de bases antisentido, se utilizó la actividad ARNasa H endógena presente en los extractos celulares preparados a partir de células 293 estables que contienen la *rev*-GFP. Se sintetizaron dos oligonucleótidos de ADN complementarios a cada uno de los dos sitios diana y se usaron como sondas para determinar la accesibilidad en extractos celulares según el protocolo de Scherr, M. *et al.*, 1998, tal como se describe en el presente documento, con algunas modificaciones menores.

Se hicieron crecer células 293 estables que contenían el gen de CMV-*rev*GFP hasta del 50 al 90% de confluencia en placas de 100 mm. Se recogieron las células usando un raspador de células y se aclararon dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) dos veces. Se resuspendieron las células en el mismo volumen de tampón de hinchamiento hipotónico (Tris-HCl 7 mM, pH 7,5, KCl 7 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM) y 1/10 del volumen final de tampón neutralizante (Tris-HCl 21 mM, pH 7,5, KCl 116 mM, MgCl<sub>2</sub> 3,6 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 6 mM) en hielo. Se sonicaron las disoluciones resuspendidas 15 segundos tres veces en un baño de agua enfriada con hielo. Se centrifugó el homogenado a 20.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se usaron los sobrenadantes inmediatamente, o se almacenaron como alícuotas en el mismo volumen de tampón de almacenamiento de glicerol (Tris-HCl 15 mM, pH 7,5, KCl 60 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, glicerol al 45%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM) a -80°C. Se usaron estas alícuotas congeladas siempre en el plazo de 3 meses tras la congelación.

Se incubaron los extractos celulares con 4  $\mu$ M de los respectivos oligodesoxirribonucleótidos antisentido de 21 pb (sitio I o II) durante 15 minutos a 37°C en un volumen total de 30  $\mu$ l de tampón de rotura (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 100 mM y DDT 10 mM). Tras la extracción con fenol y la precipitación con etanol, se digirieron los precipitados con 20 U de ADNasa I durante 45 minutos a 37°C, seguido por extracción con fenol y precipitación con etanol. Se resuspendieron los precipitados en agua DEPC y se controlaron para determinar la absorción a DO<sub>260</sub>.

Se llevó a cabo la reacción de transcriptasa inversa (RT) usando de 300 ng a 1  $\mu$ g de ARN total preparado a partir de la muestra de extracto de 30  $\mu$ l anterior con 5 U de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (Mo-MLV Rtase, Life Technologies, Inc. NY) según las instrucciones del fabricante.

Se realizó el cebado de la primera cadena con 20 pmol de cebador 3' de un oligómero complementario a la secuencia *rev* o 50 ng de cebadores de hexámero al azar. Se usó actina  $\beta$  como control interno. Se realizaron reacciones de PCR para cada conjunto de cebadores por separado en un volumen total de 50  $\mu$ l que contenían Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 0,1 mM de cada dNTP, 0,4  $\mu$ M de cada cebador, 1,5 U de taq ADN polimerasa y 2  $\mu$ l de muestra de reacción de RT. Se llevó a cabo la reacción de PCR a 94°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos y a 72°C durante 30 segundos para un total de 24 a 36 ciclos tras estudiar el ciclo de control.

Se separaron las muestras de reacción en un gel de agarosa al 1,2% y se visualizaron con tinción de bromuro de etidio, luego se cuantificaron usando al programa de cuantificación AlphaImager™ (Alpha Innotech Corp.).

### Ejemplo 2

#### *Constructos*

Se insertó un fragmento de SacII (rellenado)-EcoRI que contiene el gen de la fusión *rev*-GFP de CMV-*rev*-GFP en sitios HindIII (rellenado)-EcoRI del vector pIND (Invitrogen), dando el constructo pIND-*rev*-GFP de (figura 1A).

Para construir los vectores de expresión de ARNip, se prepararon dos casetes usando el vector pTZ U6+1 (figura 1B). (Bertrand, E. *et al.*, 1997; Good, P.D. *et al.*, 1997). Un casete alberga las secuencias sentido de 21 nucleótidos y el otro una secuencia antisentido de 21 nucleótidos. Se diseñaron estas secuencias para dirigirse al sitio I o bien al sitio II (figura 1A). Se insertó una sucesión de 6T en el extremo 3' de cada sitio de 21 meros seguido por un sitio de restricción XbaI. Se prepararon las secuencias sentido o antisentido 20 de nucleótidos (excluyendo el primer G) con una sucesión de 6T y el sitio de restricción XbaI a partir de oligonucleótidos sintéticos (Lee, N.S. *et al.*, 2001; Lee, N.S. *et al.*, 1999). El primer G de los insertos se proporcionó por el sitio Sal I del vector cuyos extremos se hicieron romos mediante nucleasa mung bean. Se digirieron los insertos mediante BsrBI para sentido y AluI para antisentido (sitio I), StuI para sentido y SnaBI para antisentido (sitio II) para el clonado de extremo romo inmediatamente en el



## ES 2 312 753 T3

sentido 3' de la secuencia promotora de U6. Se digirieron los extremos 3' de los insertos con Xba I para la inserción en el vector pTZU6+1 digerido por Sal I (romo)- Xba I para crear las unidades de transcripción deseadas (figura 1C).

Para crear los plásmidos en los que ambas secuencias, sentido y antisentido están en el mismo vector, se digirieron los vectores que abrigan la secuencia sentido pTZU6+1 con BamHI (que se rellenó usando T4 ADN polimerasa) y HindIII. Se subclonaron los fragmentos digeridos que contienen las secuencias sentido en los sitios SphI (rellenado por T4 ADN polimerasa)-HindIII de los constructos AS(I) o AS(II) antisentido, generando ambas, unidades de transcripción sentido y antisentido [S/AS (I) o S/AS (II)] (figura 1C). Se confirmaron las secuencias de ADN para cada uno de los constructos anteriores antes de usar.

### Ejemplo 3

#### *Cultivo celular*

Se hicieron crecer células 293/EcR a 37°C en EMEM suplementado con FBS al 10%, L-glutamina 2 mM y 0,4 mg/ml de Zeocina. Veinticuatro horas antes de la transfección, se volvieron a sembrar en placa las células en placas de 24 ó 6 pocillos al 50-70% de confluencia con medio reciente sin Zeocina. Se llevó a cabo la transfección conjunta de plásmidos diana (pIND-*rev*-GFP) y siDNAs en una proporción 1:1 con reactivo Lipofectamina Plus™ (Life Technologies, GibcoBRL) tal como se describe por el fabricante. 0,5 mg de pIND-*rev*-GFP y 0,5 mg de siDNAs y 0,1 mg de pCMV- lacZ (para eficacia de transfección), formulada en Lipofectamina Plus, se aplicaron por cultivo de 6 pocillos. Se incubaron las células durante la noche y en el día siguiente se añadió ponasterona A 5 mM (Invitrogen) para inducir la expresión de pIND-*rev*-EGFP. Dos días tras la inducción se recogieron las células transfectadas para medir la fluorescencia de EGFP mediante FACS usando un citómetro de flujo modular (Cytomation, FI). Se normalizaron las eficacias de transfección usando un ensayo fluorescente  $\beta$ -galactosidasa (Diagnostic Chemicals Ltd, CN). También se realizó obtención de imagen en microscopio fluorescente para monitorizarla expresión de EGFP. Para la visualización microscópica, se hicieron crecer las células sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos. Se llevaron a cabo las transfecciones conjuntas sobre cubreobjetos de vidrio usando 0,25 mg cada un de ADN de plásmido de expresión *rev*-EGFP y ARNip (total 0,5 mg). Tras 2 días, se fijaron las células transfectadas en PFA 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente y se trataron con reactivo antidesvanecimiento que contenía DAPI. Se recogieron las imágenes usando un microscopio Olympus BX50 y una videocámara DEI-750 (Optronics) con aumento de 40x con un tiempo de exposición de 1/8 s. Se confirmó el silenciamiento específico de los genes diana en al menos tres experimentos independientes.

### Ejemplo 4

#### *Transferencia de tipo Northern*

Se prepararon muestras de ARN de células 293-EcR transfectadas conjuntamente transitoriamente con pIND-*rev*-GFP y ARNip y sometido a inducción de ponasterona A tal como descrito anteriormente. Se realizó el aislamiento del ARN total usando el ARN STAT-60 (TEL-TEST B) según las instrucciones del fabricante. Se resolvió el ARN total sobre un gel de acrilamida al 10%/urea 8 M para ARNip o un gel de agarosa al 1%/formamida para la diana, y se transfirió sobre membrana Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech). Se realizaron las etapas de hibridación y lavado a 37°C. Para detectar el ARNip sentido o antisentido, se usaron sondas de ADN radiomarcadas de 21 meros. También se exploraron con sonda ARNsn de U6 humano y ARNm de GAPDH como patrones internos. Para detectar las ribozimas dirigidas frente a sitio II del ARNm de *rev*, una sonda complementaria de 42 meros para todo el núcleo de ribozima y se usó secuencias flanqueantes (esta sonda también detecta el oligómero ARNip para antisentido sitio II). Para la caracterización de los ARN 46 de tamaño anómalo, se trataron ARN total de S/AS (I+II) con una mezcla de RNAasa A y T1 durante 30 minutos a 37°C con o bien sin precalentar a 90°C durante 5 minutos.

Para detección del ARNm de *rev*-EGFP, se usó una sonda complementaria 25 meros para el ARNm de EFP de la proteína de fusión *rev*-GFP.

### Ejemplo 5

#### *Ensayo antiviral VIH-1*

Para determinación de la actividad anti-VIH-1 del ARNip, se realizaron ensayos transitorios mediante transfección conjunta de ADNip y ADN proviral de VIH-1 infeccioso, pNL4-3 en células 293. Antes de la transfección, se hicieron crecer las células durante 24 horas en placas de seis pocillos en 2 ml EMEM complementado con FBS al 10% y L-glutamina 2 mM, y se transfectaron usando reactivo Lipofectamina Plus™ (Life Technologies, GibcoBRL) tal como se describe por el fabricante. Se formularon las mezclas de ADN constituidas por 0,8  $\mu$ g de ADNip o controles, y 0,2  $\mu$ g de pNL4-3 en lípidos catiónicos y se aplicaron a las células. Después de 1, 2, 3 y 4 días, se recogieron los sobrenadantes y se analizaron para determinar el antígeno p24 de VIH-1 (Beckman Coulter Corp). Se calcularon los valores de p24 con el auxilio del lector de placa de ELISA Dynatech MR5000 (Dynatech Lab Inc). También se realizó la viabilidad celular usando un recuento de exclusión de colorante Trypan Blue en 4 días después de la transfección.

Lo anterior demuestra la utilidad de la invención para, entre otras cosas, diseñar y someter a prueba transcritos de ARNip para diversas aplicaciones terapéuticas y genéticas. También se cree que la invención demuestra por primera vez la expresión funcional de ARNip en células de mamífero.

Los resultados anteriores también demuestran la utilidad de ARNip como agentes inhibidores de VIH-1. Combinando varios constructos de ARNip dirigidos como diana a diferentes sitios en el genoma VIH-1, debería ser posible superar la resistencia genética del virus, creando de ese modo un enfoque de terapia genética potente de infección por VIH-1.

Las publicaciones y otros materiales citados en el presente documento para aclarar los antecedentes de la invención y para proporcionar detalles adicionales con respecto a la práctica de la invención se incorporan en el presente documento por referencia en la misma extensión como si indicasen individualmente para incorporarse por referencia.

Aunque la invención se ha dado a conocer por referencia a los detalles de las realizaciones preferidas de la invención, debe entenderse que la divulgación pretende ser ilustrativa y no tener un sentido limitativo.

## Bibliografía

1. **Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G.J.** An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296 (2000).

2. **Fire, A.** RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet* 15, 358-363 (1999).

3. **Sharp, P.A.** RNA interference—2001. *Genes Dev* 15, 485-490 (2001).

4. **Elbashir, S.M. et al.** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498 (2001).

5. **Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. & Morgan, R.A.** Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 9742-9747 (2001).

6. **Bertrand, E. et al.** The expression cassette determines the functional activity of ribozymes in mammalian cells by controlling their intracellular localization. *RNA* 3, 75-88 (1997).

7. **Good, P.D. et al.** Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei. *Gene Ther* 4, 45-54 (1997).

8. **Scherr, M. & Rossi, J.J.** Rapid determination and quantitation of the accessibility to native RNAs by antisense oligodeoxynucleotides in murine cell extracts. *Nucleic Acids Res* 26, 5079-5085 (1998).

9. **Scherr, M. et al.** Detection of Antisense and Ribozyme Accessible Sites on Native mRNAs: Application to NCOA3 mRNA. *Mol Ther* 4, 454-460 (2001).

10. **Lee, N.S. et al.** Functional colocalization of ribozymes and target mRNAs in *Drosophila* oocytes. *Faseb J* 15, 2390-2400 (2001).

11. **Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. & Hannon, G.J.** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366 (2001).

12. **Clemens, J.C. et al.** Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 6499-6503 (2000).

13. **Lipardi, C., Wei, Q. & Paterson, B.M.** siRNA as Random Degradative PCR. siRNA Primers Convert mRNA into dsRNAs that Are Degraded to Generate New siRNAs. *Cell* 107, 297-307 (2001).

14. **Sijen, T. et al.** On the Role of RNA Amplification in dsRNA-Triggered Gene Silencing. *Cell* 107, 465-476 (2001).

15. **Elbashir, S.M., Lendeckel, W. & Tuschl, T.** RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200 (2001).

16. **Ui-Tei, K., Zenno, S., Miyata, AND. & Saigo, K.** Sensitive assay of RNA interference in *Drosophila* and Chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target. *FEBS Lett* 479, 79-82 (2000).

17. **Wianny, F. & Zernicka-Goetz, M.** Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* 2, 70-75 (2000).

18. **Kennerdell, J.R. & Carthew, R.W.** Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95, 1017-1026 (1998).

19. **Fire, A. et al.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811 (1998).

## ES 2 312 753 T3

20. **Oelgeschlager, M., Larrain, J., Geissert, D. & Of Robertis, E.M.** The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature* 405, 757-763 (2000).

5 21. **Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H. & Schultz, R.M.** Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 127, 4147-4156 (2000).

22. **Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T.H. & Baulcombe, D.C.** SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Embo J* 20, 2069-2078 (2001).

10 23. **Cogoni, C. & Macino, G.** Posttranscriptional gene silencing in Neurospora by a RecQ DNA helicase. *Science* 286, 2342-2344 (1999).

15 24. **Nykanen, A., Haley, B. & Zamore, P.D.** ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309-321 (2001).

25 25. **Smardon, A. et al.** EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol* 10, 169-178 (2000).

20 26. **Lee, N.S., Bertrand, E. & Rossi, J.** mRNA localization signals can enhance the intracellular effectiveness of hammerhead ribozymes. *RNA* 5, 1200-1209 (1999).

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uno o más vectores para su uso en terapia que comprenden (i) un primer casete que comprende un promotor de ARN pol III operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica la cadena sentido de una molécula de ARN de interferencia bicatenario, pequeño (ARNip) y (ii) un segundo casete que comprende un promotor de ARN pol III operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica la cadena antisentido de la molécula de ARNip, en los que el primer casete y el segundo casete están en el mismo vector o están en vectores separados y en los que cuando el uno o más vectores se introducen en una célula de mamífero la molécula de ARNip puede expresarse e iniciar la interferencia de ARN de la expresión de un gen diana en la célula de mamífero, inhibiendo de ese modo la expresión del gen diana.
- 10 2. El uno o más vectores según la reivindicación 1, en los que la célula de mamífero es una célula humana.
- 15 3. El uno o más vectores según la reivindicación 1, en los que el primer y segundo casetes están en vectores separados.
- 20 4. El uno o más vectores según la reivindicación 1, en los que el primer y el segundo casetes están en el mismo vector.
- 25 5. El uno o más vectores según la reivindicación 1, en los que el vector es un vector de plásmido.
6. El uno o más vectores según la reivindicación 1, en los que el vector es un vector viral.
7. El uno o más vectores según la reivindicación 1, en los que el promotor de ARN pol III es un promotor de ARN pol III U6 de mamífero.
- 30 8. El uno o más vectores según la reivindicación 1, en los que el gen diana es un gen diana de VIH.
9. El uno o más vectores según la reivindicación 8, en los que el VIH es VIH-1.
10. El uno o más vectores según la reivindicación 9, en los que el gen diana de VIH es VIH-1 *rev*.
11. El uno o más vectores según la reivindicación 9, en los que el gen diana de VIH es VIH-1 *tat*.
- 35 12. El uno o más vectores según la reivindicación 9, en los que el gen diana de VIH es ambos VIH-1 *rev* y VIH-1 *tat*.
- 40 13. El uno o más vectores según la reivindicación 9, en los que la célula de mamífero es una célula humana infectada por VIH.
- 45 14. Uso de uno o más vectores para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del VIH, en el que el uno o más vectores comprenden (i) un primer casete que comprende un promotor de ARN pol III operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica la cadena sentido de una molécula de ARN de interferencia bicatenario, pequeño (ARNip) y (ii) un segundo casete que comprende un promotor de ARN pol III operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica la cadena antisentido de la molécula de ARNip, en los que el primer casete y el segundo casete están en el mismo vector o están en vectores separados y en los que cuando el uno o más vectores se introducen en una célula de mamífero la molécula de ARNip puede expresarse e iniciar la interferencia de ARN de la expresión de un gen diana de VIH en la célula de mamífero, inhibiendo de ese modo la expresión del gen diana de VIH.
- 50 15. El uso según la reivindicación 14, en el que la célula de mamífero es una célula humana.
16. El uso según la reivindicación 14, en el que el primer y el segundo casetes están en vectores separados.
- 55 17. El uso según la reivindicación 14, en el que el primer y el segundo casetes están en el mismo vector.
18. El uso según la reivindicación 14, en el que el vector es un vector de plásmido.
19. El uso según la reivindicación 14, en el que el vector es un vector viral.
- 60 20. El uso según la reivindicación 14, en el que el promotor de ARN pol III es un promotor de ARN pol III U6 de mamífero.
21. El uso según la reivindicación 14, en el que el VIH es VIH-1.
- 65 22. El uso según la reivindicación 21, en el que el gen diana de VIH es VIH-1 *rev*.
23. El uso según la reivindicación 21, en el que el gen diana de VIH es VIH-1 *tat*.

## ES 2 312 753 T3

24. El uso según la reivindicación 21, en el que el gen diana de VIH es ambos VIH-1 *rev* y VIH-1 *tat*.

25. El uso según la reivindicación 14, en el que la célula de mamífero es una célula humana infectada por VIH.

5 26. Un procedimiento *in vitro* para someter a prueba la expresión y función de moléculas de ARN de interferencia pequeño (ARNip), que comprende cointroducir en una célula de mamífero *in vitro* (a) uno o más vectores que comprenden (i) un primer casete que comprende un promotor de ARN pol III operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica la cadena sentido de una molécula de ARN de interferencia bicatenario pequeño (ARNip) y (ii)  
10 un segundo casete que comprende un promotor de ARN pol III operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica la cadena antisentido de la molécula de ARNip, en los que el primer casete y el segundo casete están en el mismo vector o están en vectores separados y (b) un vector que comprende un promotor operativamente unido a un gen diana, hacer crecer la célula en condiciones en las que se expresa la molécula de ARNip y someterla a prueba para determinar la iniciación de la interferencia de ARN de la expresión del gen diana, mediante lo cual se somete a prueba la función de la molécula de ARNip.

15 27. El procedimiento según la reivindicación 26, en el que la célula de mamífero es una célula humana.

28. El procedimiento según la reivindicación 26, en el que el primer y el segundo casetes están en vectores separados.

20 29. El procedimiento según la reivindicación 26, en el que el primer y el segundo casetes están en el mismo vector.

30. El procedimiento según la reivindicación 26, en el que el promotor de ARN pol III es un promotor de ARN pol III U6 de mamífero.

25

30

35

40

45

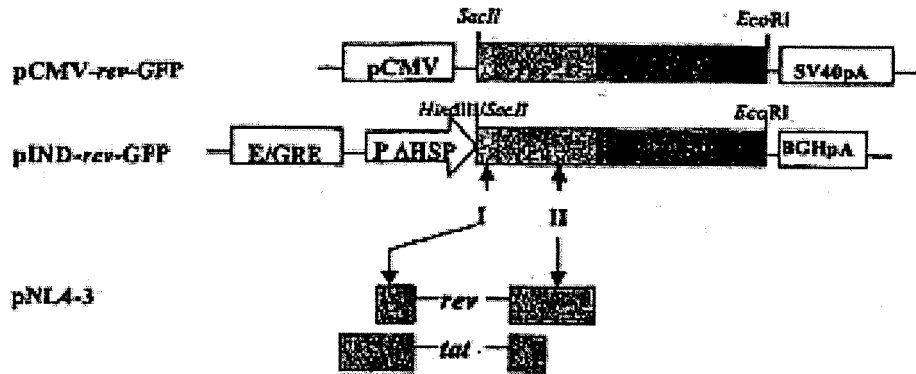
50

55

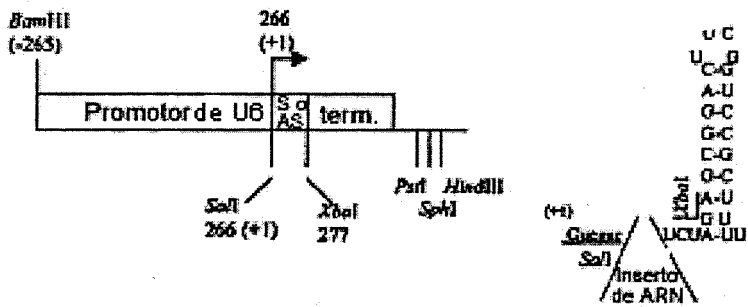
60

65

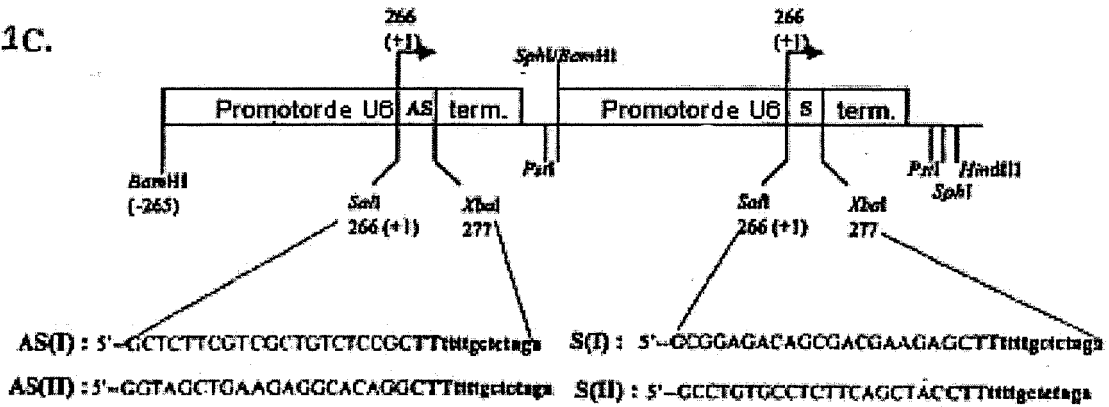
1A.



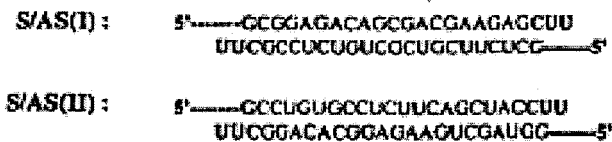
1B.



1C.



1D.



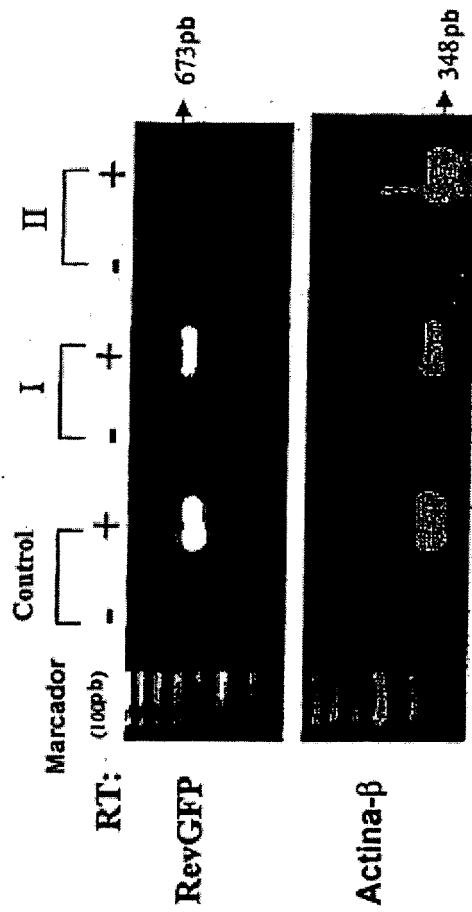


Fig. 2

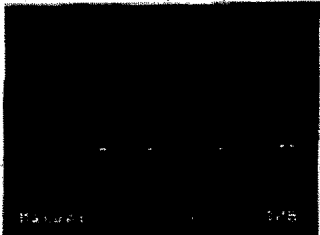

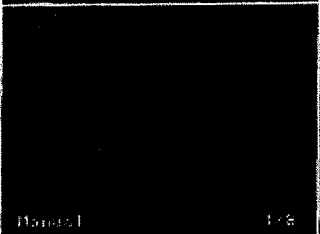
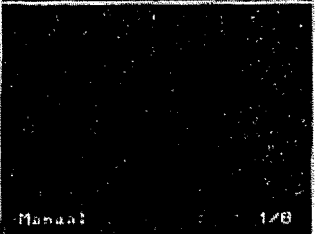
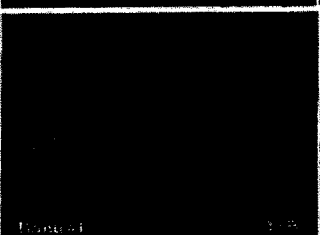
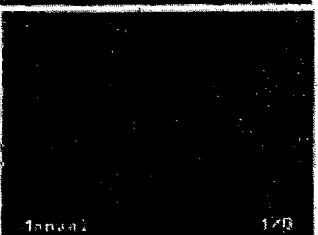
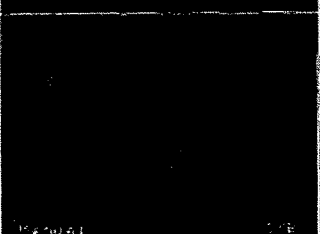
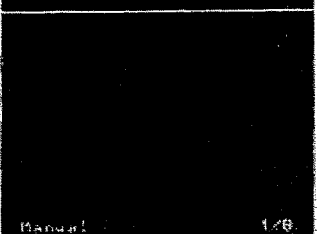
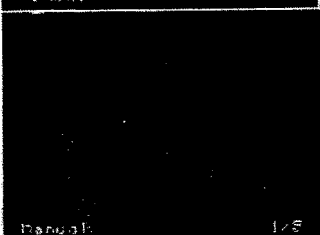

<b>A</b>			<b>F</b>
<b>B</b>			<b>G</b>
<b>C</b>			<b>H</b>
<b>D</b>			<b>I</b>
<b>E</b>			<b>J</b>

Fig 3



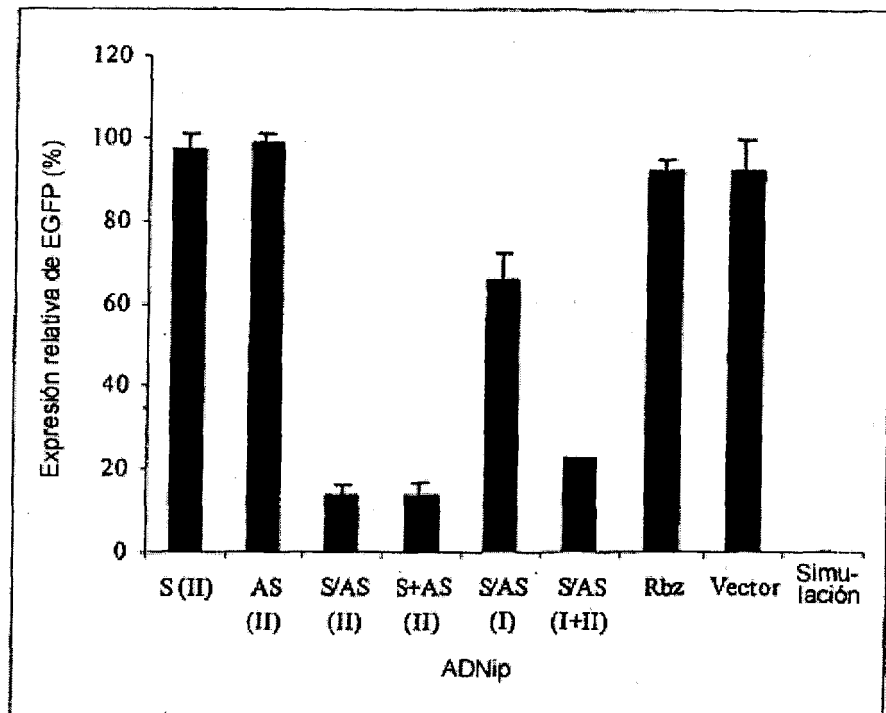
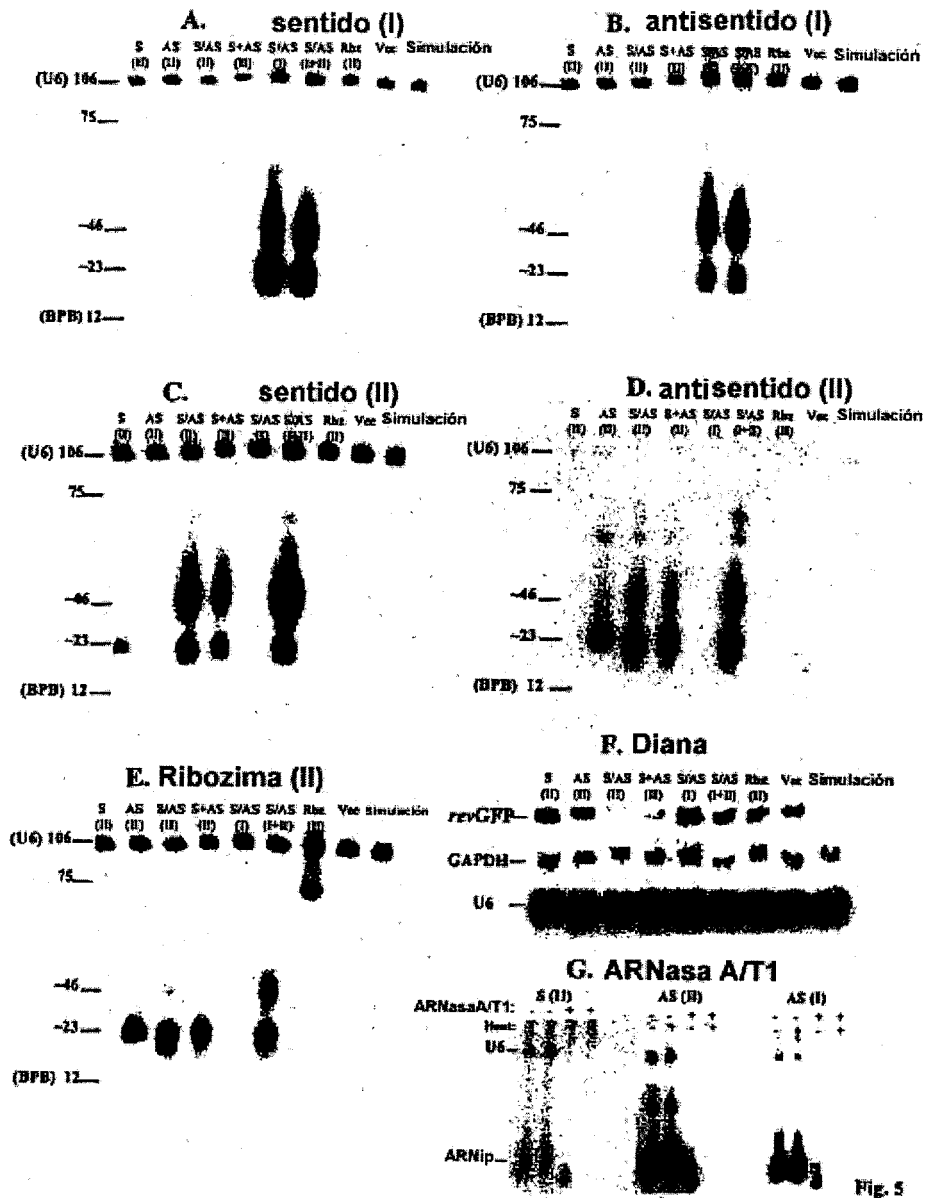


Fig. 4



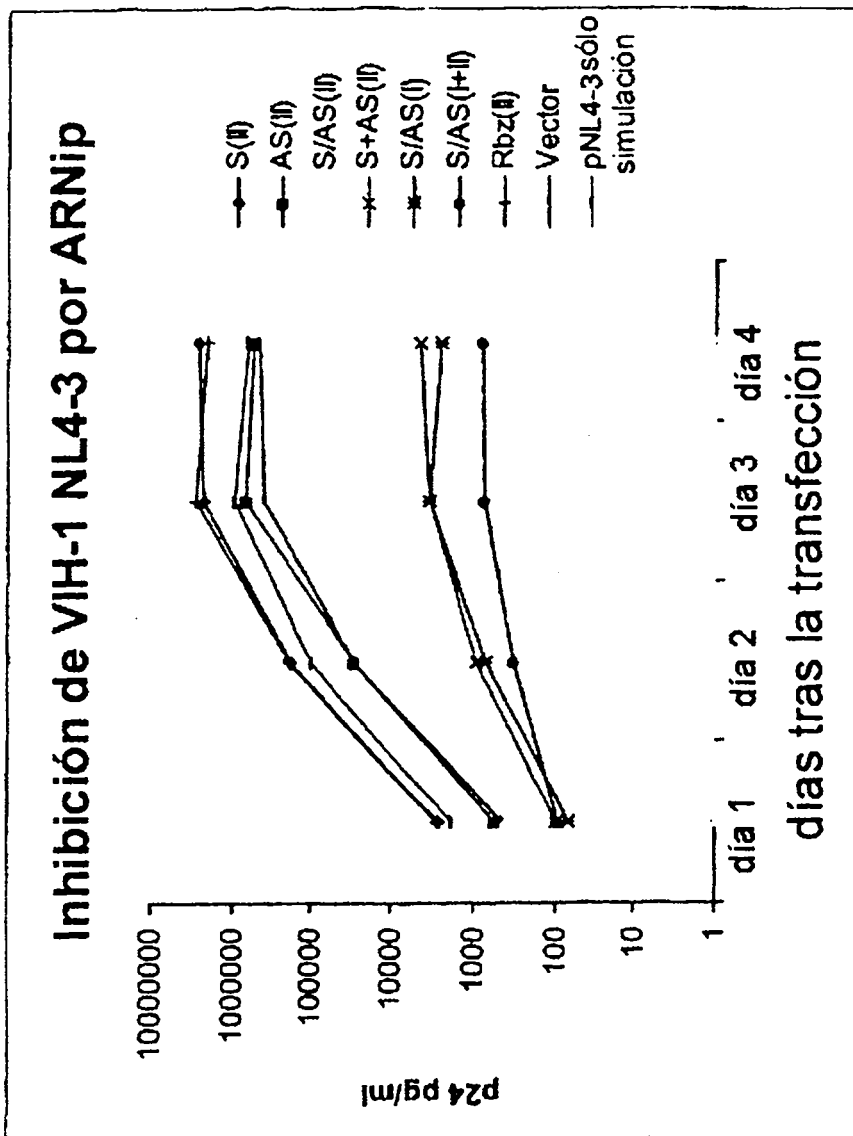


Fig. 6

# ES 2 312 753 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Rossi, John  
Lee, Nan-Sook  
5
- <120> PROCEDIMIENTOS PARA PRODUCIR MOLÉCULAS DE ARN DE INTERFERENCIA EN CÉLULAS  
DE MAMÍFERO Y USOS TERAPÉUTICOS PARA TALES MOLÉCULAS
- 10 <130> 1954-392
- <150> US 60/356127  
<151> 14-02-2002  
15
- <160> 11
- <170> PatentIn versión 3.2  
20
- <210> 1  
<211> 35  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia artificial
- <220>  
30 <223> ADNip antisentido
- <400> 1  
35 gctcttcgct gctgtctccg ctttttgct ctaga 35
- <210> 2  
<211> 35  
<212> ADN  
40 <213> Secuencia artificial
- <220>  
45 <223> ADNip sentido
- <400> 2  
50 gcggagacag cgacgaagag ctttttgct ctaga 35
- <210> 3  
<211> 35  
<212> ADN  
55 <213> Secuencia artificial
- <220>  
60 <223> ADNip antisentido
- <400> 3  
65 ggtagctgaa gaggcacagg ctttttgct ctaga 35
- <210> 4

## ES 2 312 753 T3

<211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
5 <220>  
<223> ADNip sentido  
10 <400> 4  
gcctgtgcct ctcagctac ctttttgct ctaga 35  
15 <210> 5  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
20 <220>  
<223> ARNip sentido  
25 <400> 5  
gcggagacag cgacgaagag cuu 23  
30 <210> 6  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
35 <220>  
<223> ARNip antisentido  
40 <400> 6  
gcucuucguc gcugucuccg cuu 23  
45 <210> 7  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
50 <220>  
<223> ARNip sentido  
55 <400> 7  
gccugugccu cuucagcuac cuu 23  
60 <210> 8  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
65 <220>

## ES 2 312 753 T3

	<223> ARNip antisentido	
	<400> 8	
5	gguagcugaa gaggcacagg cuu	23
	<210> 9	
10	<211> 26	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Secuencia de terminación	
	<400> 9	
20	ucuagagcgg acuucggucc gcuuuu	26
	<210> 10	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Sitio diana de ARNip	
	<400> 10	
35	gcctgtgcct ctteagctac c	21
	<210> 11	
40	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Sitio diana de ARNip sitio diana	
	<400> 11	
50	gcggagacag cgacgaagag c	21
55		
60		
65		