



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 336 887**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01922870 .9**

96 Fecha de presentación : **30.03.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1309726**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2003**

54 Título: **Mediadores de interferencia por ARN específicos de secuencias de ARN.**

30 Prioridad: **30.03.2000 US 193594 P**
01.12.2000 EP 00126325
31.01.2001 US 265232 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.04.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.04.2010

73 Titular/es: **WHITEHEAD INSTITUTE FOR
BIOMEDICAL RESEARCH**
Nine Cambridge Center
Cambridge, Massachusetts 02142, US
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften e.V.,
Massachusetts Institute of Technology y
University of Massachusetts

72 Inventor/es: **Tuschl, Thomas;**
Sharp, Phillip, A.;
Zamore, Phillip, D. y
Bartel, David, P.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 336 887 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

Mediadores de interferencia por ARN específicos de secuencias de ARN.

5 **Antecedentes de la invención**

La interferencia por ARN o "iARN" es un término inicialmente acuñado por Fire y colaboradores para describir la observación de que el ARN bicatenario (ARNbc) puede bloquear la expresión génica cuando se introduce en gusanos (Fire *et al.* (1998) Nature 391, 806-811). El ARNbc dirige el silenciamiento postranscripcional, específico de genes en muchos organismos, incluyendo vertebrados, y ha proporcionado una nueva herramienta para el estudio de la función génica. La iARN implica la degradación del ARNm, pero se desconocen muchos de los mecanismos bioquímicos subyacentes a esta interferencia. Se necesita la recapitulación de las características principales de la iARN *in vitro* para el análisis bioquímico del fenómeno.

15 Tuschl T *et al* (Genes Dev., 13, 3191-97, 1999) dan a conocer un extracto libre de células del blastodermo sincitial de embriones de *Drosophila* que media en la interferencia por ARN. Se describe el uso del extracto para estudiar la iARN. La referencia concluye que se requiere una longitud mínima de ARNbc de más de 49 pares de bases.

20 Hammond SM *et al* (Nature, 404, 293-96, 2000) dan a conocer el silenciamiento de la expresión génica en células de *Drosophila* cultivadas mediante transfección con ARN bicatenario específico de secuencia. Se encuentra que los extractos de las células transfectadas contienen una actividad nucleasa que cofracciona con fragmentos de ADN de aproximadamente 25 pb.

25 **Sumario de la invención**

La presente invención, que se define mediante las reivindicaciones adjuntas, proporciona un procedimiento para producir ARN bicatenario desde 21 hasta 23 nucleótidos de longitud que comprende:

- 30 (a) combinar ARN bicatenario con un extracto soluble que media en la interferencia por ARN, produciendo de este modo una combinación; y
- (b) mantener la combinación de (a) en condiciones en las que el ARN bicatenario se procesa para dar ARN bicatenario desde 21 hasta 23 nucleótidos de longitud.

35 También se describen procedimientos relacionados que usan la interferencia por ARN, incluyendo procedimientos para mediar en la interferencia por ARN, de examen de la función génica, de la producción de células silenciadas y de la identificación de los ARN de 21-23 nucleótidos que median en la interferencia por ARN.

40 Los procedimientos de la presente invención se identificaron usando la interferencia mediada por ARNbc específico de genes en un sistema libre de células derivado del blastodermo sincitial de embriones de *Drosophila*. El sistema *in vitro* complementa enfoques genéticos para analizar minuciosamente la base molecular de la iARN. Como se describe en el presente documento, se examinaron los mecanismos moleculares subyacentes a la iARN usando el sistema *in vitro* de *Drosophila*. Los resultados mostraron que la iARN es dependiente de ATP aunque se desacople de la traducción del ARNm. Es decir, no se requiere la síntesis de proteínas para la iARN *in vitro*. En la reacción de iARN, ambas cadenas (sentido y antisentido) del ARNbc se procesan dando lugar a fragmentos o segmentos pequeños de ARN desde aproximadamente 21 hasta aproximadamente 23 nucleótidos (nt) de longitud (los ARN con movilidad en geles de secuenciación que corresponden a marcadores que son de 21-23 nt de longitud, denominado opcionalmente en lo sucesivo ARN de 21-23 nt). El procesamiento del ARNbc en fragmentos pequeños de ARN no requiere el ARNm seleccionado como diana, lo que demuestra que las especies pequeñas de ARN se generan mediante el procesamiento del ARNbc y no como un producto de degradación de ARNm dirigido por ARNbc. El ARN sólo se rompe dentro de la región de identidad con el ARNbc. La ruptura se produce en sitios separados en 21-23 nucleótidos, el mismo intervalo observado para el propio ARNbc, lo que sugiere que los fragmentos de 21-23 nucleótidos del ARNbc guían la ruptura del ARNm. Esos ARN purificados de 21-23 nt que median en la iARN confirman que estos fragmentos guían la ruptura del ARNm.

55 Por consiguiente, lo que se describe en el presente documento son moléculas de ARN aisladas (bicatenario; monocatenario) desde 21 hasta 23 nucleótidos que median en la iARN. Es decir, los ARN aislados mediante la degradación de ARNm de un gen al que corresponde el ARN (median en la degradación del ARNm que es el producto transcripcional del gen, que también se denomina en lo sucesivo gen diana). Por conveniencia, tal ARNm también se denomina en lo sucesivo en el presente documento ARNm que va a degradarse. Como se usa en el presente documento, los términos ARN, molécula(s) de ARN, segmento(s) de ARN y fragmento(s) de ARN se usan indistintamente para referirse al ARN que media en la interferencia por ARN. Estos términos incluyen ARN bicatenario, ARN monocatenario, ARN aislado (ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido de manera recombinante), así como ARN alterado, que difiere del ARN que se produce de manera natural mediante la adición, 65 deleción, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Tales alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como al/a los extremo(s) del ARN de 21-23 nt o internamente (a uno o más nucleótidos del ARN). Los nucleótidos en las moléculas de ARN pueden comprender también nucleótidos no convencionales, incluyendo nucleótidos que no se producen de manera natural o desoxirribonucleótidos. Colectivamente, todos los ARN alterados

se denominan en lo sucesivo análogos o análogos de ARN que se producen de manera natural. El ARN de 21-23 nucleótidos sólo necesita ser suficientemente similar al ARN natural que tiene la capacidad para mediar (media) en la iARN. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “media en la iARN” se refiere a (indica) la capacidad para distinguir que ARN van a degradarse mediante el maquinaria o proceso de la iARN. El ARN que media en la iARN interactúa con la maquinaria de la iARN de tal manera que dirige la maquinaria para degradar un ARNm particular. En una realización, se describen en el presente documento moléculas de ARN de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos que dirigen la ruptura del ARNm específico al que corresponde su secuencia. No es necesario que la correspondencia de las secuencias sea perfecta, sino que la correspondencia debe ser suficiente para permitir que el ARN dirija la ruptura por iARN del ARNm diana. En una realización particular, las moléculas de ARN de 21-23 nt comprenden un grupo hidroxilo en 3’.

La presente invención también se refiere a procedimientos para producir moléculas de ARN de 21 a 23 nucleótidos con capacidad para mediar la ruptura por iARN. En una realización, se usa el sistema *in vitro* de *Drosophila*. En esta realización, se combina el ARNbc con un extracto soluble derivado de embrión de *Drosophila*, produciendo de este modo una combinación. La combinación se mantiene en condiciones en las que el ARNbc se procesa para dar moléculas de ARN de 21 a 23 nucleótidos. En otra realización, se usa el sistema *in vitro* de *Drosophila* para obtener secuencias de ARN de 21-23 nucleótidos que median en la interferencia por ARN del ARNm de un gen particular (por ejemplo, oncogén, gen viral). En esta realización, el ARN bicatenario que corresponde a una secuencia del gen que va seleccionarse como diana se combina con un extracto soluble derivado del embrión de *Drosophila*, produciendo de este modo una combinación. La combinación se mantiene en condiciones en las que el ARN bicatenario se procesa para dar lugar a ARN de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud. Como se muestra en el presente documento, el ARN de 21-23 nt media en el ARN del ARNm del gen seleccionado como diana (el gen cuyo ARNm va a degradarse). El procedimiento para obtener los ARN de 21-23 nt utilizando el sistema *in vitro* de *Drosophila* además puede comprender aislar la secuencia de ARN de la combinación.

También se describe en el presente documento, el ADN de 21-23 nt producido mediante los procedimientos de la presente invención, así como los ARN de 21-23 nt, producidos mediante otros procedimientos, tales como síntesis química o técnicas de ADN recombinante, que tienen las mismas o substancialmente las mismas secuencias que los ARN producidos de manera natural que median en la iARN, tales como los producidos mediante los procedimientos de la presente invención. Todos estos se denominan en lo sucesivo ARN de 21-23 nt que median en la interferencia por ARN. Como se usa en el presente documento, el término ARN aislado incluye el ARN obtenido mediante cualquier medio, incluyendo el procesamiento o ruptura del ARNbc tal como se describe en el presente documento; la producción mediante procedimientos de síntesis química; y la producción mediante técnicas de ADN recombinante. También se describen los usos de los ARN de 21-23 nt, tales como para el tratamiento terapéutico o profiláctico y composiciones que comprenden los ARN de 21-23 nt que median la iARN, tales como composiciones farmacéuticas que comprenden los ARN de 21-23 nt y un vehículo apropiado (por ejemplo, un tampón o agua).

La presente invención también se refiere a procedimientos para mediar en la interferencia por ARN del ARNm de un gen en una célula o en el organismo (por ejemplo, un mamífero tal como un ratón o un ser humano). En una realización, se introduce el ARN de 21-23 nt que se dirige al ARNm que va a degradarse en la célula o el organismo. La célula o el organismo se mantienen en las condiciones en que se produce la degradación del ARNm, mediando de este modo la interferencia por ARN del ARNm del gen en la célula o el organismo. La célula o el organismo puede ser uno en que se produce la iARN cuando se obtiene la célula o el organismo, o una célula o un organismo puede ser uno que se ha modificado de modo que se produzca la iARN (por ejemplo, mediante la adición de componentes obtenidos de una célula o extracto celular que median en la iARN o la activación de componentes endógenos). Como se usa en el presente documento, la expresión “célula u organismo en que se produce la iARN” incluye tanto una célula como un organismo en que se produce la iARN cuando se obtiene la célula o el organismo, o una célula o un organismo que se han modificado de modo que se produzca la iARN. En otra realización, el procedimiento para mediar en la interferencia por ARN de un gen en una célula comprende combinar el ARN bicatenario que corresponde a una secuencia del gen con un extracto soluble derivado del embrión de *Drosophila*, produciendo de este modo una combinación. La combinación se mantiene en condiciones en las que el ARN bicatenario se procesa para dar lugar a ARN de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos. El ARN de 21 a 23 nt entonces se aísla e introduce en la célula o el organismo. La célula o el organismo se mantienen en condiciones en las que se produce la degradación del ARNm del gen, mediando de este modo en la interferencia por ARN del gen en la célula o el organismo. Como se describió para la realización anterior, la célula o el organismo es uno en que se produce de forma natural la iARN (cuando obtiene la célula o el organismo) o que se ha codificado de tal manera que se produce la iARN. Los ARN de 21-23 nt también pueden producirse mediante otros procedimientos, tales como procedimientos de síntesis química o técnicas de ADN recombinante.

También se describen en el presente documento los componentes bioquímicos de una célula, tal como una célula de *Drosophila*, que procesa el ARN bicatenario para dar a ARN de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos. Además, se describen los componentes bioquímicos de una célula que están implicados en el transporte dirigido al ARNm mediante ARN de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos. En ambas realizaciones, los componentes bioquímicos pueden obtenerse de una célula en la que se producen o pueden producirse mediante otros procedimientos, tales como procedimientos de síntesis química o de ADN recombinante. Tal como se usa en el presente documento, el término “aislado” incluye materiales (por ejemplo, componentes bioquímicos, ARN) obtenidos de una fuente en que se producen y materiales producidos mediante procedimientos tales como procedimientos de síntesis química o de ácido nucleico (ADN, ARN) recombinante.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para el silenciamiento génico (parcial o completamente) del gen seleccionado como diana, proporcionando por tanto una alternativa a los procedimientos disponibles actualmente de silenciar (o inactivar) un gen o genes. Este procedimiento del silenciamiento de la expresión génica puede usarse terapéuticamente o para fines de investigación (por ejemplo, para generar modelos de estados de enfermedad, para examinar la función de un gen para evaluar si un agente actúa sobre un gen, para validar dianas para el descubrimiento de fármacos). Esto último sólo se aplica a organismos no humanos. En aquellos casos en que se elimina la función génica, el organismo no humano o la célula resultante también pueden denominarse una desactivación. Una realización del procedimiento para producir células silenciadas comprende introducir en una célula en la que se va a silenciar un gen (denominado en lo sucesivo un gen seleccionado como diana) ARN de 21 a 23 nt que se dirige al gen y mantener el organismo o la célula resultante en condiciones en las que se produce la iARN, dando como resultado la degradación del ARNm del gen seleccionado como diana, produciendo de este modo células silenciadas. También se describen los organismos no humanos y las células silenciadas producidos mediante el presente procedimiento.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para examinar o evaluar la función de un gen en una célula o un organismo. En una realización, se introduce ARN de 21 a 23 nt que se dirige al ARNm del gen para la degradación en una célula o un organismo no humano en que se produce la iARN. La célula o el organismo se refieren a una célula o a un organismo de prueba. La célula o el organismo no humano de prueba se mantienen en condiciones en las que se produce la degradación del ARNm del gen. Entonces se observa el fenotipo de la célula o el organismo de prueba y se compara con el de una célula o un organismo control apropiados, tal como una célula o un organismo no humano correspondiente que se trata de la misma manera a menos que el gen seleccionado como diana (específico) no se dirija. Un ARN de 21 a 23 nt que no se dirige al ARNm para su degradación puede introducirse en la célula o el organismo no humano control en vez del ARN introducido en la célula o el organismo no humano de prueba, aunque no es necesario hacerlo así. Una diferencia entre los fenotipos de las células y los organismos de prueba y control proporciona información sobre la función del ARNm degradado. En otra realización, el ARN bicatenario que corresponde a una secuencia del gen se combina con un extracto soluble que media en la iARN, tal como el extracto soluble derivado del embrión de *Drosophila* descrito en el presente documento, en condiciones en las que el ARN bicatenario se procesa para generar ARN bicatenario de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos. El ARN de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos se aísla y entonces se introduce en una célula o un organismo no humano en los que se produce la iARN (la célula de prueba o el organismo de prueba). La célula de prueba o el organismo de prueba se mantienen en condiciones en las que se produce la degradación del ARNm. Entonces se observa y compara el fenotipo de la célula o el organismo de prueba con el de un control apropiado, tal como una célula o un organismo correspondiente que se trata de la misma manera que la célula o el organismo de prueba a menos que el gen seleccionado como diana no se dirija. Una diferencia entre los fenotipos de las células o los organismos de prueba y control proporciona información sobre la función del gen seleccionado como diana. La información proporcionada puede ser suficiente para identificar (definir) la función del gen o puede usarse conjuntamente con la información obtenida de otros ensayos o análisis para hacerlo así.

El objeto de la presente invención es también un procedimiento para validar si un agente actúa sobre un gen. En este procedimiento, el ARN desde 21 hasta 23 nucleótidos que se dirige al ARNm que va a degradarse se introduce en una célula o un organismo no humano en los que se produce la iARN. La célula o el organismo (que contiene el ARN introducido) se mantiene en condiciones en las que se produce la degradación del ARNm, y el agente se introduce en la célula o el organismo. Se determina si el agente tiene un efecto sobre la célula o el organismo; si el agente no tiene efecto sobre la célula o el organismo, entonces el agente actúa sobre el gen.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para validar si un producto génico es una diana para el descubrimiento o desarrollo de fármacos. El ARN desde 21 hasta 23 nucleótidos que se dirige al ARNm que corresponde al gen para la degradación se introduce en una célula o en un organismo no humano. La célula o el organismo se mantienen en condiciones en las que se produce la degradación del ARN, dando como resultado la expresión disminuida del gen. Se determina si la expresión disminuida del gen tiene un efecto sobre la célula o el organismo, en los que si la expresión disminuida del gen tiene un efecto, entonces el producto génico es una diana para el descubrimiento o el desarrollo de fármacos.

También se describe en el presente documento un procedimiento para tratar una enfermedad o estado asociados con la presencia de una proteína en un individuo que comprende administrar al individuo ARN desde aproximadamente 21 hasta aproximadamente 23 nucleótidos que se dirige al ARNm de la proteína (el ARNm que codifica la proteína) para la degradación. Como resultado, la proteína no se produce o no se produce en la medida en que sería en ausencia del tratamiento.

También se describe un gen identificado mediante la secuenciación de moléculas de ARN de 21 a 23 nucleótidos endógenas que median en la interferencia por ARN.

La presente invención también abarca un procedimiento para identificar sitios diana dentro de un ARNm que es particularmente adecuado para la iARN, así como un procedimiento para la evaluación de la capacidad de los ARN de 21 a 23 nt para mediar en la iARN.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es una representación esquemática de los ARNm indicador y ARNbc de Rr-Luc y Pp-Luc. Las longitudes y las posiciones de los ARNs, ARNas y ARNbc se muestran como barras negras con respecto a las secuencias de ARNm indicador de Rr-Luc y Pp-Luc. Los rectángulos negros indican las dos secuencias codificantes de luciferasa no relacionadas, las líneas corresponden a las regiones no traducidas en 5' y 3' de los ARNm.

La figura 2A es un gráfico de la proporción de las actividades de luciferasa tras el transporte dirigido al ARNm 50 pM de Pp-Luc con ARNs, ARNas, o ARNbc 10 nM del segmento de 505 pb del gen Pp-Luc que muestra una interferencia específica de genes mediante el ARNbc *in vitro*. Los datos son los valores promedio de siete ensayos \pm desviación estándar. Se usaron cuatro lisados preparados independientemente. La actividad de la luciferasa se normalizó en el control de tampón; una proporción igual a uno indica que no hay interferencia específica de genes.

La figura 2B es un gráfico de la proporción de las actividades de luciferasa tras el transporte dirigido al ARNm 50 pM de Rr-Luc con ARNs, ARNas, o ARNbc 10 nM del segmento de 501 pb del gen Rr-Luc que muestra una interferencia específica de genes mediante el ARNbc *in vitro*. Los datos son los valores promedio de seis ensayos \pm desviación estándar. Una proporción de Rr-Luc/Pp-Luc igual a uno indica que no hay interferencia específica de genes.

La figura 3A es una representación esquemática de la estrategia experimental usada para demostrar que la incubación en el lisado de embrión de *Drosophila* potencia el ARNbc para la interferencia específica de genes. El mismo ARNbc usado en la figura 2 (o tampón) se incubó previamente en serie usando diluciones de dos veces en seis reacciones sucesivas con lisado de embrión de *Drosophila*, después se sometió a prueba para determinar su capacidad para bloquear la expresión de ARNm. Como control, se diluyó la misma cantidad de ARNbc (10 nM) o tampón directamente en el tampón y se incubó con los ARNm de Pp-Luc y Rr-Luc y se lisó.

La figura 3B es un gráfico de potenciación cuando hay transporte dirigido al ARNm de Pp-Luc. Las columnas negras indican el ARNbc o el tampón que previamente se incubó en serie; las columnas blancas corresponden a una dilución de 32 veces diluida directa del ARNbc. Los valores se normalizaron para los de los controles con tampón.

La figura 3C es un gráfico de potenciación cuando hay transporte dirigido al ARNm de Rr-Luc. El control de tampón correspondiente se muestra en la figura 3B.

La figura 4 es un gráfico que muestra el efecto del ARNbc competidor sobre la interferencia específica de genes. Se añadieron concentraciones crecientes del ARNbc del gen nanos (508 pb) a las reacciones que contenían ARNbc 5 nM (el mismo ARNbc usado en la figura 2A y 2B) de transporte dirigido al ARNm de Pp-Luc (columnas negras, eje izquierdo) o al ARNm de Rr-Luc (columnas blancas, eje derecho). Cada reacción contenía tanto un ARNm diana (Pp-Luc para las columnas negras, Rr-Luc para las blancas) como un ARNm control no relacionado (Rr-Luc para las columnas negras, Pp-Luc para las blancas). Los valores se normalizaron en el control con tampón (no mostrado). Las reacciones se incubaron en condiciones convencionales (véase Procedimientos).

La figura 5A es un gráfico que muestra el efecto del ARNbc sobre la estabilidad del ARNm. Círculos, ARNm de Pp-Luc; cuadrados, ARNm de Rr-Luc; símbolos sombreados, incubación con tampón; símbolos no sombreados, incubación con ARNbc de Pp.

La figura 5B es un gráfico que muestra la estabilidad del ARNm de Rr-Luc incubado con ARNbc de Rr o ARNbc de Pp. Cuadrados sombreados, tampón; cuadrados no sombreados, ARNbc de Pp (10 nM); círculos no sombreados, ARNbc de Rr (10 nM).

La figura 5C es un gráfico que muestra la dependencia sobre la longitud del ARNbc: Se evaluó la estabilidad del ARNm de Pp-Luc tras la incubación en el lisado en presencia del tampón o ARNbc de diferentes longitudes. Cuadrados sombreados, tampón; círculos no sombreados, ARNbc de 49 pb (10 nM); triángulos no sombreados invertidos, ARNbc de 149 pb (10 nM); triángulos no sombreados, ARNbc de 505 pb (10 nM); rombos no sombreados, ARNbc de 997 pb (10 nM). Las reacciones se incubaron en condiciones convencionales (véase Procedimientos).

La figura 6 es un gráfico que muestra que la iARN requiere de ATP. La creatina quinasa (CK) usa creatina fosfato (CP) para regenerar ATP. Círculos, +ATP, +CP, +CK; cuadrados, -ATP, +CP, +CK; triángulos, -ATP, -CP, +CK; triángulos invertidos, -ATP, +CP, -CK.

La figura 7A es un gráfico de la síntesis de proteínas, como se refleja mediante la actividad de la luciferasa producida tras la incubación de ARNm de Rr-Luc en la reacción de iARN *in vitro* durante 1 hora, en presencia de los inhibidores de la síntesis de proteínas, anisomicina, cicloheximida o cloranfenicol, con respecto a una reacción sin ningún inhibidor lo que muestra que la iARN no requiere de la traducción del ARNm.

La figura 7B es un gráfico que muestra la traducción de los ARNm de Pp-Luc con extremos ocupados con 7-metilguanósina- y adenosina- (círculos y cuadrados, respectivamente) en la reacción de la iARN en ausencia de ARNbc, tal como se midió mediante la actividad de la luciferasa producida en una hora de incubación.

ES 2 336 887 T3

La figura 7C es un gráfico que muestra la incubación en una reacción de iARN de ARNm de Pp-Luc con extremos ocupados con 7-metil-guanosina radiomarcado uniformemente con ³²P (círculos) y ARNm de Pp-Luc con extremos ocupados con adenosina (cuadrados), en presencia (símbolos no sombreados) y ausencia (símbolos sombreados) de ARNbc de Pp-Luc de 505 pb.

5

La figura 8A es un gráfico del análisis en gel de agarosa de desnaturalización del ARNm de Pp-Luc incubado en una reacción de iARN convencional con tampón, ARNas de Pp de 505 nt o ARNbc de Pp de 505 pb para las veces indicadas que muestran que el ARNas provoca una pequeña cantidad de iARN *in vitro*.

10

La figura 8B es un gráfico del análisis en gel de agarosa de desnaturalización del ARNm de Rr-Luc incubado en una reacción de iARN convencional con tampón, ARNas de Pp de 505 nt o ARNbc de Pp de 505 pb para las veces indicadas que muestran que el ARNas provoca una pequeña cantidad de iARN *in vitro*.

15

La figura 9 es una representación esquemática de las posiciones de tres ARNbc, "A", "B", y "C", con respecto al ARNm de Rr-Luc.

20

La figura 10 indica la ruptura de los sitios mapeados en los primeros 267 nt del ARNm de Rr-Luc (SEC ID NO: 1). La barra azul debajo de la secuencia indica la posición de ARNbc "C", y los círculos azules indican la posición de los sitios de ruptura provocados por este ARNbc. La barra verde señala la posición del ARNbc "B", y los círculos verdes, los sitios de ruptura. La barra magenta indica la posición del ARNbc "A", y los círculos magenta, las rupturas. Una ruptura excepcional dentro de una serie de 7 uracilos se marca con una cabeza de flecha roja.

25

La figura 11 es un modelo propuesto para la iARN. Se prevé que la iARN empieza con la ruptura del ARNbc para dar productos de 21-23 nt mediante una nucleasa específica de ARNbc, tal vez en un complejo multiproteico. Estos ARNbc cortos pueden disociarse entonces mediante una helicasa dependiente de ATP, posiblemente un componente del complejo inicial, para dar ARNas de 21-23 nt que entonces podrían dirigir la ruptura del ARNm. Se supone que los ARNas cortos permanecen asociados con las proteínas específicas de la iARN (círculos) que originalmente estaban unidas mediante el ARNbc de longitud completa, explicándose así la ineficacia del ARNas para desencadenar la iARN *in vivo e in vitro*. Finalmente, una nucleasa (triángulos) rompería el ARNm.

30

La figura 12 es un gráfico de barras que muestra el silenciamiento génico específico de secuencias mediante los fragmentos de 21-23 nt. La proporción de la actividad de la luciferasa tras el transporte dirigido al ARNm de Pp-Luc y Rr-Luc mediante ARNbc 5nM de Pp-Luc o Rr-Luc (500 pb) o fragmentos de 21-23 nt aislados a partir de una incubación anterior del ARNbc respectivo en el lisado de *Drosophila*. La cantidad de 21-23-meros aislados presentes en la reacción de incubación corresponde a aproximadamente la misma cantidad de 21-23-meros generados durante una incubación de reacción con ARNbc 5 nM de 500 pb. Los datos de los valores promedio de 3 ensayos y sus desviaciones estándar se dan mediante las barras de error. La actividad de la luciferasa se normalizó en el control con tampón.

35

La figura 13A ilustra la purificación de fragmentos de ARN sobre una columna de filtración en gel Superdex HR 200 10/30 (Pharmacia) usando el procedimiento descrito en el ejemplo 4. El ARNbc se marcó con ³²P y se representa gráficamente la radioactividad recuperada en cada fracción de la columna. También se analizaron las fracciones mediante electroforesis en gel de desnaturalización (recuadro).

40

La figura 13B demuestra la capacidad del ARN de Rr-luciferasa, tras la incubación en el lisado de *Drosophila* y el fraccionamiento como en la figura 13A, para mediar en la interferencia específica de secuencias con la expresión de un ARNm diana de Rr-luciferasa. Se sometió a prueba un microlitro de cada fracción resuspendida en una reacción de iARN *in vitro* de 10 microlitros (véase en el ejemplo 1). Este procedimiento produce una concentración de ARN en la reacción de iARN *in vitro* convencional que es aproximadamente igual a la concentración de esas especies de ARN en la reacción original antes de cargar en la columna. La luminiscencia relativa por segundo se ha normalizado para el valor promedio de los dos tampones control.

45

La figura 13C es el control de especificidad para la figura 13B. Demuestra que el ARN fraccionado de la figura 13B no media eficazmente en la interferencia específica de secuencias con la expresión de un ARNm de Pp-luciferasa. Los ensayos son tal como en la figura 13B.

50

Las figuras 14A y 14B son representaciones esquemáticas de constructos indicadores y ARNip dúplex. La figura 14A ilustra las regiones del gen indicador luciferasa de la luciérnaga (*Pp-luc*) y pensamiento de mar (*Rr-luc*) a partir de los plásmidos pGL2-control, pGL3-control y pRL-TK (Promega). Se indican los elementos de regulación de SV40, el promotor de timidina quinasa del VHS y dos intrones (líneas). La secuencia de GL3 luciferasa es idéntica en un 95% a GL2, sin embargo RL no tiene ninguna relación con ambas. La expresión de la luciferasa de pGL2 es aproximadamente 10 veces menor que la de pGL3 en células de mamíferos transfectadas. La región dirigida mediante los ARNip dúplex se indica como una barra negra por debajo de la región codificante de los genes de luciferasa. La figura 14B muestra las secuencias sentido (arriba) y antisentido (abajo) de los ARNip dúplex que se dirigen a GL2 (SEC ID NOS: 10 y 11), GL3 (SEC ID NOS: 12 y 13) y RL (SEC ID NOS: 14 y 15) luciferasa. Los ARNip dúplex de GL2 y GL3 difieren en sólo 3 sustituciones de nucleótidos individuales (recuadro en gris). Como control no específico, se sintetizó un dúplex con la secuencia de GL2 invertida, GL2inv (SEC ID NOS: 16 y 17). Los 2 nt protuberantes en 3' de 2'-desoximidina se indican como TT; GL2u (SEC ID NOS: 18 y 19) es similar al ARNip de GL2 pero contiene ribouridina en 3' sobresaliente.

55

Las figuras 15A-15J son gráficos que muestran la interferencia por ARN mediante ARNip dúplex. Las proporciones de la luciferasa diana con respecto a control se normalizaron para un control con tampón (bu, barras negras); las barras grises indican las proporciones de GL2 o GL3 luciferasa de *Photinus pyralis* (*Pp-luc*) con respecto a RL luciferasa de *Renilla reniformis* (*Rr-luc*) (eje izquierdo), las barras blancas indican las proporciones de RL con respecto a GL2 o GL3 (eje derecho). Las figuras 15A, 15C, 15E y 15I muestran los resultados de los experimentos realizados con la combinación de los plásmidos indicadores pRL-TK y pGL2-control, las figuras 15B, 15D, 15F, 15H y 15J con plásmidos indicadores pRL-TK y pGL3-control. La línea celular usada para el experimento de interferencia se indica en la parte superior de cada gráfico. Las proporciones de *Pp-luc/Rr-luc* para el control con tampón (bu) variaban entre 0,5 y 10 para pGL2/pRL, y entre 0,03 y 1 para pGL3/pRL, respectivamente, antes de la normalización y entre las diversas líneas celulares sometidas a prueba. Los datos representados se promediaron a partir de 3 experimentos independientes \pm D.E.

Las figuras 16A-16F son gráficos que muestran los efectos de los ARNip de 21 nt, 50 pb, y los ARNbc de 500 pb sobre la expresión de luciferasa en células HeLa. La longitud exacta de los ARNbc largos se indica por debajo de las barras. Las figuras 16A, 16C y 16E describen experimentos realizados con plásmidos indicadores pRL-TK y pGL2-control, las figuras 16B, 16D y 16F con plásmidos indicadores pRL-TK y pGL3-control. Los datos se promediaron a partir de dos experimentos independientes \pm D.E. Figuras 16A, 16B, la expresión de *Pp-luc* absoluta, representada en unidades de luminiscencia arbitrarias. Figuras 16C, 16D, la expresión de *Rr-luc*, representada en unidades de luminiscencia arbitrarias. Figuras 16E, 16F, las proporciones de la luciferasa normalizada diana con respecto a control. Las proporciones de la actividad de luciferasa para ARNip dúplex se normalizaron para un control con tampón (bu, barras negras); las proporciones de luminiscencia para ARNbc de 50 o 500 pb se normalizaron para las respectivas proporciones observadas para ARNbc de 50 o 500 pb a partir de la GFP humanizada (hG, barras negras). Debe observarse que las diferencias totales en la secuencia entre los ARNbc de 49 pb y 484 pb que se dirigen a GL2 y GL3 no son suficientes para conferir especificidad entre las dianas de GL2 y GL3 (identidad ininterrumpida de 43 nt en un segmento de 49 pb, identidad ininterrumpida más larga de 239 nt en un segmento de 484 pb) (Parrish, S., *et al.*, Mol, Cell, 6: 1077-1087 (2000)).

Descripción detallada de la invención

El ARN bicatenario (ARNbc) dirige la degradación específica de secuencias del ARN mediante un proceso conocido como interferencia por ARN (iARN). Se sabe que el proceso se produce en una amplia variedad de organismos, incluyendo embriones de mamíferos y otros vertebrados. Usando el sistema *in vitro* de *Drosophila* descrito en el presente documento se ha demostrado que el ARNbc se procesa para dar lugar a segmentos de ARN de 21-23 nucleótidos (nt) de longitud, y además, que cuando se purifican estos fragmentos de 21-23 nt y se añaden de nuevo a los extractos de *Drosophila*, median en la interferencia por ARN en ausencia del ARNbc más largo. Por tanto, estos fragmentos de 21-23 nt son mediadores específicos de secuencias de la degradación del ARN. Una señal molecular, que puede ser la longitud específica de los fragmentos, debe estar presente en estos fragmentos de 21-23 nt para reclutar factores celulares implicados en la iARN. En el presente documento se describen estos fragmentos de 21-23 nt y su uso para inactivar específicamente la función génica. El uso de estos fragmentos (u oligonucleótidos producidos de manera recombinante o sintetizados químicamente de la misma naturaleza o similar) permite el transporte dirigido de ARNm específicos para su degradación en células de mamíferos. El uso de ARNbc largos en células de mamíferos para provocar la iARN no es usualmente práctico, presumiblemente debido a los efectos nocivos de la respuesta del interferón. El transporte dirigido específico de una función génica particular, que es posible con los fragmentos de 21-23 nt, es útil en aplicaciones terapéuticas y genómicas funcionales.

En particular, en el presente documento se describen moléculas de ARN de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos que median en la iARN. En una realización, la descripción se refiere a moléculas de ARN de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos que dirigen la ruptura del ARNm específico al que correspondan. Las moléculas de ARN de 21-23 nucleótidos también pueden comprender un grupo hidroxilo en 3'. Las moléculas de ARN de 21-23 nt pueden ser monocatenarias o bicatenarias (como dos ARN de 21-23 nt); tales moléculas pueden ser de extremos romos o comprender extremos protuberantes (por ejemplo, 5', 3'). En realizaciones específicas, la molécula de ARN es bicatenaria y o bien de extremos romos o bien comprende extremos protuberantes (como dos ARN de 21-23 nt).

En una realización, al menos una cadena de la molécula de ADN tiene una protuberancia en 3' desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 6 nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos de pirimidina, nucleótidos de purina) de longitud. En otras realizaciones, la protuberancia en 3' es desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 nucleótidos, desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3 nucleótidos y desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 4 nucleótidos de longitud. En una realización, la molécula de ARN es bicatenaria, una cadena tiene una protuberancia en 3' y la otra cadena puede ser de extremos romos o tener una protuberancia. En la realización en la que la molécula de ARN es bicatenaria y ambas cadenas comprenden una protuberancia, la longitud de las protuberancias puede ser igual o diferente para cada cadena. En una realización particular, el ARN comprende cadenas de 21 nucleótidos que se aparean y que tienen protuberancias desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3, en particular de aproximadamente 2, nucleótidos en ambos extremos 3' del ARN. Con el fin de mejorar más la estabilidad del ARN, las protuberancias en 3' pueden estabilizarse frente a la degradación. En una realización, el ARN se estabiliza incluyendo nucleótidos de purina, tales como nucleótidos de adenosina o guanósina. Como alternativa, la sustitución de los nucleótidos de pirimidina con análogos modificados, por ejemplo, se tolera la sustitución de las protuberancias

en 3' de 2 nucleótidos de uridina con 2'-desoxitimidina y no afecta la eficacia de la iARN. La ausencia de un 2'-hidroxilo mejora significativamente la resistencia a nucleasas de la protuberancia en medio de cultivo tisular.

Las moléculas de ARN de 21-23 nt pueden obtenerse usando varias técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el ARN puede sintetizarse químicamente o producirse de manera recombinante usando procedimientos conocidos en la técnica. También pueden obtenerse ARN de 21-23 nt usando el sistema *in vitro* de *Drosophila* descrito en el presente documento. El uso del sistema *in vitro* de *Drosophila* implica combinar ARNbc con un extracto soluble derivado de embrión de *Drosophila*, produciendo de este modo una combinación. La combinación se mantiene en condiciones en las que el ARNbc se procesa para dar ARN de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos. También puede usarse el sistema *in vitro* de *Drosophila* para obtener ARN de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud que median en la interferencia por ARN del ARNm de un gen particular (por ejemplo, oncogén, gen viral). En esta realización, se combina ARN bicatenario que corresponde a una secuencia del gen con un extracto soluble derivado de embrión de *Drosophila*, produciendo de este modo una combinación. La combinación se mantiene en condiciones en las que el ARN bicatenario se procesa para dar ARN de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos. Como se muestra en el presente documento, el ARN de 21-23 nt media en la iARN del ARNm que va degradarse. La presente descripción también se refiere a las moléculas de ARN de 21-23 nt producidas mediante los procedimientos descritos en el presente documento.

En una realización, los procedimientos descritos en el presente documento se usan para identificar u obtener moléculas de ARN de 21-23 nt que son útiles como mediadores específicos de secuencias de la degradación de ARN y, por tanto, para inhibir ARNm como ARNm humanos, que codifican productos asociados con o causante de una enfermedad o un estado no deseado. Por ejemplo, la producción de una oncoproteína o proteína viral puede inhibirse en seres humanos con el fin de impedir que se produzca la enfermedad o estado, limitar el grado en que se produce o revertirlo. Si se conoce la secuencia del gen que va a dirigirse en seres humanos, pueden producirse y someterse a prueba ARN de 21-23 nt para determinar su capacidad para mediar en la iARN en una célula, tal como una célula de ser humano o de otro primate. Las moléculas de ARN humano de 21-23 nt que se ha demostrado que median en la iARN pueden someterse a prueba si se desea, en un modelo de animal apropiado para evaluar además su eficacia *in vivo*. Pueden producirse copias adicionales de ARN de 21-23 nt que se ha demostrado que median en la iARN mediante los procedimientos descritos en el presente documento.

El procedimiento de obtención de la secuencia de ARN de 21-23 nucleótidos usando el sistema *in vitro* de *Drosophila* puede comprender además aislar la secuencia de ARN de la combinación. Las moléculas de ARN de 21-23 nt pueden aislarse usando varias técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse electroforesis en gel para separar los ARN de 21-23 nt de la combinación, comprendiendo los cortes de gel las secuencias de ARN extraídas y los ARN eluidos a partir de los cortes de gel. Como alternativa, pueden usarse procedimientos no desnaturizantes, tales como cromatografía en columna no desnaturizante, para aislar el ARN producido. Además, puede usarse cromatografía (por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaños), centrifugación en gradiente de glicerol, purificación de afinidad con anticuerpos, para aislar ARN de 21-23 nt. El complejo ARN-proteína aislado del sistema *in vitro* de *Drosophila* también puede usarse directamente en los procedimientos descritos en el presente documento (por ejemplo, el procedimiento para mediar en la iARN del ARNm de un gen). La descripción abarca extractos solubles derivados de embrión de *Drosophila* que median en la iARN. El extracto soluble de *Drosophila* puede obtenerse en una variedad de formas. Por ejemplo, puede obtenerse el extracto soluble del blastodermo sincitial de los embriones de *Drosophila* como se describe en los ejemplos 1, 2 y 3. Los extractos solubles pueden derivarse de otras células en las que se produce la iARN. Como alternativa, los extractos solubles pueden obtenerse de una célula que no lleva a cabo la iARN. En este caso, los factores necesarios para mediar en la iARN pueden introducirse en una célula de este tipo y entonces se obtiene el extracto soluble. Los componentes del extracto también pueden sintetizarse químicamente y/o combinarse usando procedimientos conocidos en la técnica.

Puede usarse cualquier ARNbc en los procedimientos de la presente invención, siempre que tenga suficiente homología con el gen seleccionado como diana para mediar en la iARN. No es necesario conocer la secuencia del ARNbc para su uso en los procedimientos de la presente invención. Como alternativa, el ARNbc para su uso en la presente invención puede corresponder a una secuencia conocida, tal como aquella de todo un gen (uno o más) o porción del mismo. No existe un límite superior sobre la longitud del ARNbc que puede usarse. Por ejemplo, el ARNbc puede oscilar desde aproximadamente 21 pares de bases (pb) del gen hasta la longitud completa del gen o más. En una realización, el ARNbc usado en los procedimientos de la presente invención es de aproximadamente 1000 pb de longitud. En otra realización, el ARNbc es de aproximadamente 500 pb de longitud. Aún en otra realización, el ARNbc es de aproximadamente 22 pb de longitud.

Los ARNs de 21 a 23 nt descritos en el presente documento pueden usarse en una variedad de formas. Por ejemplo, pueden usarse moléculas de ARN de 21 a 23 nt para mediar en la interferencia por ARN del ARNm de un gen en una célula o un organismo. En una realización específica, se introduce el ARN de 21 a 23 nt en células humanas o un ser humano con el fin de mediar en la interferencia por ARN en las células o en las células del individuo, de modo que se previene o trata una enfermedad o un estado no deseable. En este procedimiento, se selecciona como diana un gen (o genes) que provoca(n) o contribuye(n) a la enfermedad o estado no deseable y se degrada el ARNm correspondiente (el producto de transcripción del gen seleccionado como diana) mediante la iARN. En este procedimiento, un ARN de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos que se dirige al ARNm correspondiente (el ARNm del gen seleccionado como diana) para su degradación, se introduce en la célula o el organismo. La célula o el organismo se mantienen en condiciones en las que se produce la degradación del ARNm

correspondiente, mediando de este modo en la interferencia por ARN del ARNm del gen en la célula o el organismo. En una realización particular, el procedimiento de mediación en la interferencia por ARN de un gen en una célula comprende combinar ARN bicatenario que corresponde a una secuencia del gen con un extracto soluble derivado de embrión de *Drosophila*, produciendo de este modo una combinación. La combinación se mantiene en condiciones en las que el ARN bicatenario se procesa para dar ARN de 21 a 23 nucleótidos. Entonces, se aísla el ARN de 21 a 23 nt y se introduce en una célula o un organismo. La célula o el organismo se mantienen en condiciones en las que se produce la degradación de ARNm del gen, mediando de este modo en la interferencia por ARN del gen en la célula o el organismo. En el caso de que el ARN de 21 a 23 nt se introduzca en una célula en la que normalmente no se produce la iARN, se introducen los factores necesarios para mediar en la iARN en una célula de este tipo o se induce la expresión de los factores necesarios en una célula de este tipo. Como alternativa, el ARN de 21 a 23 nt producido mediante otros procedimientos (por ejemplo, síntesis química, producción de ADN recombinante) para tener una composición igual o suficientemente similar al ARN de 21 a 23 nt que se sabe que media en la iARN, puede usarse de manera similar para mediar en la iARN. Lo que también se da a conocer es que tales ARN de 21 a 23 nt pueden alterarse mediante la adición, delección, sustitución o modificación de uno o más nucleótidos y/o pueden comprender materiales no nucleotídicos. También se da a conocer un procedimiento ex vivo de tratamiento de las células de un individuo para degradar un(os) gen(es) que provoca(n) o se asocia(n) con una enfermedad o estado no deseable, tales como leucemia o SIDA. En esta realización, las células que van a tratarse se obtienen del individuo usando los procedimientos conocidos (por ejemplo, flebotomía o extracción de médula ósea) y se introducen en las células ARN de 21-23 nt que median en la degradación del/de los ARNm correspondiente(s), que entonces se reintroducen en el individuo. Si es necesario, los componentes bioquímicos necesarios para que se produzca la iARN también pueden introducirse en las células.

El ARNm de cualquier gen puede dirigirse para su degradación usando los procedimientos de mediación en la interferencia de ARNm descritos en el presente documento. Por ejemplo, cualquier ARNm celular o viral, puede dirigirse, y, como resultado, disminuirá la expresión de la proteína codificada (por ejemplo, una oncoproteína, una proteína viral). Además, el ARNm de cualquier proteína asociada con/causante de una enfermedad o estado no deseable puede dirigirse para su degradación usando los procedimientos descritos en el presente documento.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para el examen de la función de un gen en una célula o un organismo no humano. En una realización, se introduce una secuencia de ARN de 21 a 23 nucleótidos que se dirige al ARNm del gen para su degradación en una célula o un organismo. La célula o el organismo se mantiene en condiciones en las que se produce la degradación del ARNm del gen. Entonces se observa y compara el fenotipo de la célula o el organismo con un control apropiado, proporcionando de este modo información acerca de la función del gen. En otra realización, el ARN bicatenario que corresponde a una secuencia del gen se combina con un extracto soluble derivado de embrión de *Drosophila* en condiciones en las que se procesa el ARN bicatenario para generar ARN de 21 a 23 nucleótidos. El ARN de 21 a 23 nucleótidos se aísla y entonces se introduce en la célula o el organismo no humano. La célula o el organismo se mantiene en condiciones en las que se produce la degradación del ARNm del gen. Entonces se observa y compara el fenotipo de la célula o el organismo con un control apropiado, identificando de este modo la función del gen.

Un aspecto adicional de esta invención es un procedimiento de evaluación de la capacidad de los ARN de 21-23 nt para mediar en la iARN y, particularmente, la determinación de qué ARN de 21-23 nt media(n) de la manera más eficaz en la iARN. En una realización del procedimiento, el ARNbc correspondiente a una secuencia de un ARNm que va degradarse se combina con un ARNm marcado de manera detectable (por ejemplo, marcado en los extremos, tal como radiomarcado) y el extracto soluble de esta invención, produciendo de este modo una combinación. La combinación se mantiene en condiciones en las que se procesa el ARN bicatenario y se degrada el ARNm. Los sitios de la ruptura más eficaz se mapean comparando la migración de los productos de ruptura del ARNm marcado con marcadores de longitud conocida. Entonces, los 21-meros que abarcan estos sitios se diseñan y se someten a prueba para determinar su eficacia en la mediación en la iARN.

Como alternativa, el extracto de la presente invención puede usarse para determinar si existe un segmento particular o segmentos particulares del ARNm que correspondan a un gen que se dirigen más eficazmente mediante la iARN que otras regiones y, por tanto, pueden ser sitios diana especialmente útiles. En una realización, el ARNbc que corresponde a una secuencia de un gen que va degradarse, se combina el ARNm marcado del gen con un extracto soluble que media en la iARN, produciendo de este modo una combinación. La combinación resultante se mantiene en condiciones en las que se degrada el ARNbc y se identifican los sitios en el ARNm que se rompen de la manera más eficaz, usando procedimientos conocidos, tal como comparación con patrones de tamaño conocido sobre un gel de secuenciación.

Visión general de los ejemplos

El análisis bioquímico de la iARN se ha vuelto posible con el desarrollo del lisado de embrión de *Drosophila in vitro* que recapitula el silenciamiento dependiente de ARNbc de la expresión génica descrita en el ejemplo 1 (Tuschl *et al.*, Genes Dev., 13:3191-7(1999)). En los sistemas *in vitro*, el ARNbc, pero no sentido o ARNs, se dirige a un ARNm correspondiente para su degradación, aunque no afecta a la estabilidad de un ARNm control no relacionado. Además, la incubación previa del ARNbc en el lisado potencia su actividad para la degradación del ARNm diana, sugiriendo que el ARNbc debe convertirse en una forma activa mediante la unión a proteínas en el extracto o mediante la modificación covalente (Tuschl *et al.*, Genes Dev., 13:3191-7 (1999)).

ES 2 336 887 T3

En el presente documento se describe el desarrollo de un sistema libre de células a partir de blastodermo sincitial de embriones de *Drosophila* que recapitula muchas de las características de la iARN. La interferencia observada en esta reacción es específica de secuencia, se promueve mediante el ARNbc, pero no mediante ARN monocatenario, funciona mediante la degradación específica de ARNm, requiere una longitud mínima de ARNbc y es lo más eficaz con ARNbc largos. Además, la incubación previa de ARNbc potencia su actividad. Estos resultados demuestran que la iARN se media mediante procesos específicos de secuencias en reacciones solubles.

Como se describe en el ejemplo 2, se usó el sistema *in vitro* para analizar los requisitos de la iARN y para determinar el destino del ARNbc y el ARNm. La iARN *in vitro* requiere ATP, pero no requiere ni la traducción del ARNm ni el reconocimiento de la ocupación de extremos con 7-metil-guanosina del ARNm seleccionado como diana. El ARNbc, pero no el ARN monocatenario, se procesa *in vitro* en una población de especies de 21-23 nt. Parece que no se requiere la desaminación de las adenosinas dentro del ARNbc para la formación de los ARN de 21-23 nt. Como se describe en el presente documento, el ARNm se rompe sólo en la región correspondiente a la secuencia del ARNbc y que el ARNm se rompe en los intervalos de 21-23 nt, indicando fuertemente que los fragmentos de 21-23 nt del ARNbc se dirigen a la ruptura del ARNm. Además, como se describe en los ejemplos 3 y 4, cuando se purifican los fragmentos de 21-23 nt y se devuelven al extracto soluble, median en el ARN.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes de ningún modo.

Ejemplo 1

Degradación del ARNm seleccionado como diana mediante ARN bicatenario in vitro

Materiales y procedimientos

ARN

El ARNm de Rr-luc estaba constituido por la secuencia codificante de Rr luciferasa de 926 nt flanqueada por 25 nt de la secuencia no traducida en 5' del policonector de plásmido pSP64 y 25 nt de la secuencia no traducida en 3' constituida por 19 nt de la secuencia del policonector de plásmido pSP64 seguido de un sitio SacI de 6 nt. El ARNm de Pp-Luc contenía la secuencia codificante de Pp-luciferasa de 1653 nt con un sitio KpnI introducido inmediatamente antes del codón de parada de Pp luciferasa. La secuencia codificante de Pp estaba flanqueada por las secuencias no traducidas en 5' constituidas por 21 nt del policonector de plásmido pSP64 seguido de los 512 nt de la región no traducida (UTR) en 5' del ARNm del gen hunchback de *Drosophila* y secuencias no traducidas en 3' constituidas por la UTR en 3' del gen hunchback de 562 nt seguido de un sitio SacI de 6 nt. Las secuencias UTR en 3' del gen hunchback usadas, contenían seis mutaciones de G-a-U que alteran la función de los elementos de respuesta del gen nanos *in vivo* e *in vitro*. Ambos ARNm indicadores terminaban en una cola de poli(A) de 25 nt codificada en el plásmido transcrito. Para ARNm tanto de Rr-Luc como de Pp-Luc, los transcritos se generaron mediante la transcripción run-off de los moldes de plásmido rotos en un sitio NsiI que seguía inmediatamente la cola de poli(A) codificada de 25 nt. Para asegurar que los transcritos terminaban con una cola de poli(A), se resecaron los moldes de transcripción rotos en NsiI con ADN polimerasa T4 en presencia de dNTP. Se usó el kit SP6 mMessage mMachine (Ambion) para la transcripción *in vitro*. Usando este kit, aproximadamente el 80% de los transcritos resultantes se ocupan en los extremos con 7-metilguanosa. El radiomarcado con ³²P se logró mediante la inclusión de α -³²P-UTP en la reacción de transcripción.

Para Pp-Luc, los ARNs, ARNas y ARNbc correspondían a las posiciones 93 a 597 en relación con el inicio de traducción, produciendo un ARNbc de 505 pb. Para Rr-Luc, los ARNs, ARNas y ARNbc, correspondían a las posiciones 118 a 618 en relación con el inicio de traducción, produciendo un ARNbc de 501 pb. El ARNbc competidor del gen nanos de *Drosophila* correspondía a las posiciones 122 a 629 en relación con el inicio de traducción, produciendo un ARNbc de 508 pb. El ARNs, ARNas y ARNbc (esquemáticos en la figura 1) se transcribieron *in vitro* con ARN polimerasa T7 a partir de moldes generados mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Tras la purificación en gel de los transcritos de ARN T7, el molde de ADN residual se eliminó mediante el tratamiento con ADNasa RQ1 (Promega). Entonces, se extrajo el ARN con fenol y cloroformo, y entonces se precipitó y disolvió en agua. La reasociación del ARN y la electroforesis en gel nativo.

Se calentó ARNs y ARNbc (0,5 μ M) en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) con NaCl 20 mM hasta 95°C durante 1 min y luego se enfrió y reasoció a temperatura ambiente durante 12 a 16 h. Los ARN se precipitaron y resuspendieron en tampón de lisis (a continuación). Para controlar la reasociación, los ARNs se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2% en tampón TBE y se tiñeron con bromuro de etidio (Sambrook *et. al.*, Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview NY. (1989)).

Preparación del lisado

Se recogieron embriones de cero a dos horas de edad de moscas Oregon R en agar-melaza con levadura a 25°C. Se retiró el corión a los embriones durante 4 a 5 min en lejía al 50% (v/v), se lavaron con agua, se secaron y se transfirieron a una trituradora de tejidos Potter-Elvehjem enfriada (Kontes). Se lisaron los embriones a 4°C en un ml de tampón de

lisis (acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM, pH 7,4, acetato de magnesio 2 mM) que contenía ditiotreitól (DTT) 5 mM y Pefabloc SC 1 mg/ml (Boehringer-Mannheim) por gramo de embriones húmedos. Se centrifugó el lisado durante 25 min a 14.500 x g a 4°C, y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido el sobrenadante en alícuotas y se almacenó a -80°C.

5

Condiciones de reacción

La preparación del lisado y las condiciones de reacción se derivaron de aquellas descritas en Hussain y Leibowitz (Hussain y Leibowitz, Gene 46:13-23 (1986)). Las reacciones contenían lisado el 50% (v/v), ARNm (concentración final de 10 a 50 pM), y tampón de lisis el 10% (v/v) que contenía el ARNs, ARNas o ARNbc (concentración final 10 mM). Cada reacción contenía también fosfato de creatina 10 mM, creatina fosfoquinasa 10 µg/ml, GTP 100 µM, UTP 100 µM, CTP 100 µM, ATP 500 µM, DTT 5 µM, RNasin (Promega) 0,1 U/ml, y 100 µM de cada aminoácido. Se ajustó la concentración final de acetato de potasio a 100 mM. Para las condiciones convencionales, las reacciones se ensamblaron en hielo y entonces se incubaron previamente a 25°C durante 10 min antes de añadir el ARNm. Tras añadir ARNm, se continuó con la incubación durante otros 60 min. Se omitió la etapa de incubación previa de 10 min durante los experimentos de las figuras 3A-3C y 5A-5C. Se extinguieron las reacciones con cuatro volúmenes de 1,25x tampón de lisis pasiva (Promega). Se detectó actividad Pp y Rr luciferasa en un luminómetro Monolight 2100 (Analytical Luminiscence Laboratory) usando el sistema de ensayo indicador de doble luciferasa (Promega).

20

Estabilidad del ARN

Se extinguieron las reacciones con ARNm radiomarcado con ³²P mediante la adición de 40 volúmenes de 2x tampón PK (Tris-HCl 200 mM, pH 7,5, EDTA 25 mM, NaCl 300 mM, dodecilsulfato de sodio al 2% p/v). Se añadió proteinasa K (E.M. Merck; disuelta en agua) hasta una concentración final de 465 µg/ml. Entonces, se incubaron las reacciones durante 15 min a 65°C, se extrajeron con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se precipitaron con un volumen igual de isopropanol. Se analizaron las reacciones mediante electroforesis en un gel de formaldehído/agarosa (0,8% p/v) (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY. (1989)). Se detectó la radioactividad exponiendo el gel de agarosa [secado a vacío sobre una membrana Nytran Plus (Amersham)] a una placa para imágenes (Fujix) y se cuantificó usando un programa Fujix Bas 2000 e Image Gauge 3.0 (Fujix).

30

Lisados comerciales

Se ensamblaron las reacciones del extracto de germen de trigo (Ambion) y el lisado de reticulocitos de conejo (Ambion) no tratado según las instrucciones del fabricante. Se incubó ARNbc en el lisado a 27°C (germen de trigo) o 30°C (lisado de reticulocitos) durante 10 min antes de la adición de los ARNm.

40

Resultados y discusión

Para evaluar si el ARNbc puede bloquear específicamente la expresión génica *in vitro*, se usaron ARNm indicadores derivados de dos genes distintos de luciferasa que no están relacionados tanto en secuencia como en especificidad de sustrato luciferina: la luciferasa de *Renilla reniformis* (pensamiento de mar) (Rr-Luc) y la luciferasa de *Photuris pennsylvanica* (luciérnaga) (Pp-Luc). Se usó el ARNbc generado de un gen para dirigir este ARNm de luciferasa mientras que el otro ARNm de luciferasa era un control interno traducido conjuntamente en la misma reacción. Se prepararon ARNbc de aproximadamente 500 pb mediante la transcripción de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa de los genes Rr-Luc y Pp-Luc. Cada ARNbc comenzaba ~ 100 pb en el sentido de 3' del inicio de traducción (figura 1). Se transcribieron el ARN sentido (s) y antisentido (as) *in vitro* y se reasociaron entre sí para producir el ARNbc. Se llevó a cabo electroforesis en gel nativo de los 501 nt de Rr y 505 nt de Pp como ARN y ARNs usados para formar los ARNbc de Rr y Pp. Se sometió a prueba cada ARNs, ARNas y ARNbc para determinar su capacidad para bloquear específicamente la expresión de su ARNm análogo pero no la expresión del ARNm de control interno no relacionado.

55

Se incubó el ARNs, ARNas o ARNbc durante 10 min en una reacción que contenía lisado de embrión de *Drosophila*, entonces se añadieron ARNm tanto de Pp-Luc como de Rr-Luc y se continuó con la incubación durante otros 60 min. El lisado de embrión de *Drosophila* traduce eficazmente el ARNm transcrito de manera exógena en las condiciones usadas. Se midieron las cantidades de las actividades de la enzima Pp-Luc y Rr-Luc y se usaron para calcular las proporciones de o bien Pp-Luc/Rr-Luc (figura 2A) o bien Rr-Luc/Pp-Luc (figura 2B). Para facilitar la comparación de los diferentes experimentos, se normalizaron las proporciones de cada experimento para la proporción observada para un control en el que se añadió tampón a la reacción en lugar de ARNs, ARNas o ARNbc.

60

La figura 2A muestra que una concentración de 10 mM del ARNbc de 505 pb idéntico a una porción de la secuencia del gen Pp-Luc inhibía específicamente la expresión del ARNm de Pp-Luc pero no afectaba a la expresión del control interno de Rr-Luc. Ni el ARNs ni el ARNas afectaban a la expresión de Pp-Luc o del control interno de Rr-Luc. Por tanto, la expresión de Pp-Luc se inhibía específicamente mediante su ARNbc análogo. Por el contrario,

65

una concentración de 10 nM del ARNbc de 501 pb dirigido frente al ARNm de Rr-Luc inhibía específicamente la expresión de Rr-Luc pero no la del control interno de Pp-Luc (figura 2B). De nuevo, los niveles comparables de ARNs o ARNs tuvieron poco o ningún efecto sobre la expresión de cualquier ARNm indicador. En promedio, el ARNbc redujo la expresión específica de luciferasa en un 70% en estos experimentos, en los que se midió la actividad luciferasa después de 1 h de incubación. En otros experimentos en los que se repuso la capacidad de traducción de la reacción mediante la adición de lisado recién preparado y los componentes de reacción, se observó en una reacción adicional de la actividad de la luciferasa seleccionada como diana en relación con el control interno.

La capacidad del ARNbc pero no del ARNs para inhibir la expresión génica en estos lisados no es simplemente una consecuencia de la mayor estabilidad del ARNbc (vida media de aproximadamente 2 h) en relación con los ARN monocatenarios (vida media de ~ 10 min). El ARNs y ARNs transcritos con una ocupación de extremos con 7-metilguanosa eran tan estables en el lisado como el ARNbc sin extremos ocupados, pero no inhibían la expresión génica. Por el contrario, el ARNbc formado a partir del ARNs y el ARNs con extremos ocupados bloquea específicamente la expresión del ARNm seleccionado como diana.

La iARN eficaz en *Drosophila* requiere la inyección de aproximadamente 0,2 fmol de ARNbc en el blastodermo sincitial del embrión (Kennerdell y Carthew, Cell 95: 1017:1026 (1998); Carthew, www1.pitt.edu/~carthew/manual/RNAi_Protocol.html (1999)). Dado que el volumen promedio de un embrión de *Drosophila* es de aproximadamente 7,3 nL, esto corresponde a una concentración intracelular de aproximadamente 25 nM (Mazur *et al.*, Cryobiology 25:543-544 (1998)). Se inhibió la expresión génica en el lisado de *Drosophila* mediante una concentración comparable de ARNbc (10 nM), pero la disminución de la concentración de ARNbc redujo diez veces la cantidad de interferencia específica. El ARNbc diez nanomolar corresponde a un exceso de 200 veces de ARNbc con respecto al ARNm diana añadido al lisado. Para someter a prueba si este exceso de ARNbc puede reflejar una etapa dependiente de la concentración y/o del tiempo en la que el ARNbc de entrada se convirtió en una forma activa para la interferencia génica específica, se examinó el efecto de la incubación previa del ARNbc en su capacidad para inhibir la expresión de su ARNm análogo. Dado que la capacidad de traducción de los lisados se reduce significativamente después de 30 min de incubación a 25°C (observaciones no publicadas), se deseaba asegurar que todos los factores necesarios para la iARN permanecieran activos durante todo el periodo de incubación previa. Por tanto, cada 30 min, se mezcló una reacción que contenía ARNbc y lisado con una reacción recién preparada que contenía el lisado no incubado (figura 3A). Tras seis transferencias en serie sucesivas que abarcaron 3 horas de incubación previa, el ARNbc, ahora diluido 64 veces en relación con su concentración original, se incubó con el lisado y 50 pM del ARNm diana durante 60 min. Finalmente, se midieron los niveles de enzima Pp-Luc y Rr-Luc. Para comparar, la cantidad de entrada de ARNbc (10 nM) se diluyó 32 veces en tampón, y se evaluó su capacidad para generar interferencia de ARNbc específica de genes en ausencia de cualquier etapa de incubación previa.

La incubación previa del ARNbc en el lisado potenció significativamente su capacidad para inhibir la expresión génica específica. Mientras que el ARNbc diluido 32 veces no mostró ningún efecto, el ARNbc incubado previamente era, dentro del error experimental, tan potente como el ARNbc sin diluir, a pesar de haber experimentado una dilución de 64 veces. Se observó potenciación del ARNbc mediante la incubación previa en los ARNbc que se dirigían tanto al ARNm de Pp-Luc (figura 3B) como al ARNm de Rr-Luc (figura 3C). Al tener en cuenta la dilución de 64 veces, la activación conferida mediante la incubación previa permitió una concentración de 156 pM de ARNbc para inhibir 50 pM de ARNm diana. Además, la dilución del ARNbc “activado” puede ser eficaz pero no se ha sometido a prueba. Se observa que aunque ambos ARNbc sometidos a prueba se activaron mediante el procedimiento de incubación previa, cada uno retuvo completamente su especificidad para interferir con la expresión sólo del ARNm al cual es homólogo. El estudio adicional de las reacciones puede proporcionar una ruta de identificación de los mecanismos de potenciación de ARNbc.

Una posible explicación para la observación que la incubación previa del ARNbc mejora su capacidad para inhibir la expresión génica en estos lisados es que factores específicos modifican y/o se asocian con el ARNbc. Por consiguiente, la adición de cantidades crecientes de ARNbc a la reacción puede titular tales factores y reducir la cantidad de interferencia específica de genes provocada por un segundo ARNbc de secuencia no relacionada. Tanto para el ARNm de Pp-Luc como el ARNm de Rr-Luc, la adición de concentraciones crecientes del ARNbc del gen nanos de *Drosophila* no relacionado a la reacción redujo la cantidad de interferencia específica de genes provocada por el transporte dirigido del ARNbc al ARNm indicador (figura 4). Ninguna de las concentraciones sometidas a prueba del ARNbc del gen nanos afectó a los niveles de traducción del ARNm no seleccionado como diana, demostrando que el ARNbc del gen nanos titulaba específicamente factores implicados en la interferencia específica de genes y no componentes de la maquinaria de traducción. Se tituló el/los factor(es) limitante(s) mediante la adición de ARNbc aproximadamente 1000 nM, un exceso de 200 veces con respecto a los 5 nM de ARNbc usado para producir la interferencia específica.

La interferencia *in vitro* puede reflejar o bien una inhibición específica de la traducción de ARNm o bien la destrucción dirigida del ARNm específico. Para distinguir estas dos posibilidades, se examinaron directamente los destinos de los ARNm de Pp-Luc y Rr-Luc usando sustratos radiomarcados con ³²P. La estabilidad de ARNm de Pp-Luc o ARNm de Rr-Luc 10 nM incubados en el lisado con o bien tampón o bien ARNbc de Pp de 505 pb (10 nM). Las muestras se desproteinizaron después del tiempo indicado y entonces los ARNm radiomarcados con ³²P se resolvieron mediante electroforesis en gel desnaturizante. En ausencia de ARNbc, tanto el ARNm de Pp-Luc como de Rr-Luc eran estables en los lisados, permaneciendo ~ 75% de ARN de entrada después de 3 h de incubación. (Aproximadamente el 25% del ARNm de entrada se degrada rápidamente en la reacción y probablemente representa el ARNm sin extremos ocupados generado mediante el proceso de transcripción *in vitro*.) En presencia de ARNbc (10 nM, 505 pb) que se

dirige al ARNm de Pp-Luc, menos del 15% del ARNm de Pp-Luc permanecía después de 3 h (figura 5A). Como se esperaba, el ARNm de Rr-Luc permanecía estable en presencia del ARNbc que se dirige al ARNm Pp-Luc. Por el contrario, el ARNbc (10 nM, 501 pb) que se dirige al ARNm de Rr-Luc provocaba la destrucción del ARNm de Rr-Luc pero no tenía ningún efecto sobre la estabilidad del ARNm de Pp-Luc (figura 5B). Por tanto, el ARNbc provocaba específicamente la degradación acelerada del ARNm al que es homólogo sin tener ningún efecto sobre la estabilidad del ARNm control no relacionado. Este hallazgo indica que *in vivo*, al menos en *Drosophila*, el efecto del ARNbc es desestabilizar directamente el ARNm diana, no cambiar la ubicación subcelular del ARNm, por ejemplo, provocando que se retengan específicamente en el núcleo, dando como resultado en una degradación no específica.

Estos resultados son consistentes con la observación que la iARN conduce a niveles de ARNm citoplasmáticos reducidos *in vivo*, tal como se mide mediante hibridación *in situ* (Montgomery *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15502-15507 (1998)) y transferencia tipo Northern (Ngo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14687-14692 (1998)). Los análisis con la transferencia tipo Northern en tripanosomas e hidra sugieren que el ARNbc reduce normalmente los niveles de ARNm en menos del 90% (Ngo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14687-14692 (1998); Lohmann *et al.*, Dev. Biol. 214:211-214 (1999)). Los datos presentados en este caso muestran que los niveles de ARNm *in vitro* se redujeron del 65% al 85% tras tres horas de incubación, un efecto comparable con las observaciones *in vivo*. También, se estaba de acuerdo con el hallazgo de que la iARN en *C. elegans* es postranscripcional (Montgomery *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15502-15507 (1998)). La explicación más simple para los efectos específicos sobre la síntesis de proteínas es que reflejan la acelerada velocidad de degradación de ARN. Sin embargo, los resultados no excluyen efectos independientes pero específicos sobre la traducción así como la estabilidad.

In vivo, la iARN parece que requiere una longitud mínima de ARNbc (Ngo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95:14687-14692 (1998)). Se evaluó la capacidad de los ARN dúplex de longitud de 49 pb, 149 pb, 505 pb y 997 pb (esquematizadas en la figura 1) para seleccionar como diana la degradación del ARNm de Pp-Luc *in vitro*. De acuerdo con las observaciones *in vivo*, el ARNbc de 49 pb era ineficaz *in vitro*, mientras que el ARNbc de 149 pb mejoraba la degradación del ARNm sólo ligeramente, y el ARNbc tanto de 505 pb como de 997 pb provocaban la fuerte degradación del ARNm (figura 5C). El ARNbc de 50 pb que se dirige a otras porciones del ARNm provoca una degradación detectable del ARNm, aunque no tan fuerte como la observada para el ARNbc de 500 pb. Por tanto, aunque algunos ARNbc cortos no median en la iARN, otros de aproximadamente la misma longitud, pero diferente composición, podrán hacerlo.

Se examinó si la interferencia específica de genes observada en los lisados de *Drosophila* era una propiedad general de los sistemas de traducción libre de células. Se examinaron los efectos de los ARNbc sobre la expresión del ARNm de Pp-Luc y Rr-Luc en lisados de reticulocitos de conejo y extractos de germen de trigo comercialmente disponibles. No hubo ningún efecto sobre la adición de 10 nM de cualquiera de ARNs, ARNas o ARNbc sobre la expresión de cualquier indicador de ARNm en los extractos de germen de trigo. Por el contrario, la adición de 10 nM de ARNbc al lisado de reticulocitos de conejo provocó una disminución no específica, profunda y rápida en la estabilidad del ARNm. Por ejemplo, la adición de ARNbc de Rr-Luc provocó la degradación de los ARNm tanto de Rr-Luc como de Pp-Luc en el plazo de 15 min. Se observó el mismo efecto no específico tras la adición de ARNbc de Pp-Luc. La destrucción no específica del ARNm inducida mediante la adición de ARNbc al lisado de reticulocitos de conejo refleja probablemente la activación observada anteriormente de ARNasa L por ARNbc (Clemens y Williams, Cell 13:565-572 (1978); Williams *et al.*, Nucleic Acids Res. 6: 1335-1350 (1979); Zhou *et al.*, Cell 72:753-765 (1993); Mathews, Interactions between Viruses and the Cellular Machinery for Protein Synthesis. In Translational Control (eds. J. Hershey, M. Mathews y N. Sonenberg), págs. 505-548. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, (1996)). Recientemente se han descrito líneas celulares de ratón que carecían de rutas antivirales inducidas por ARNbc (Zhou *et al.*, Virology 258:435-440 (1999)) y pueden ser útiles en la búsqueda de la iARN en mamíferos. Aunque se conoce que existe la iARN en algunas células de mamífero (Wianny y Zernicka-Goetz Nat. Cell Biol. 2: 70-75 (2000)), en muchos tipos de células de mamífero su presencia probablemente se oculta por la rápida inducción por ARNbc de respuestas antivirales no específicas.

La destrucción dirigida por ARNbc de ARNm específico es característica de la iARN, que se ha observado *in vivo* en muchos organismos, incluyendo *Drosophila*. Los sistemas descritos anteriormente recapitulan en una reacción *in vitro* muchos aspectos de la iARN. El ARNm seleccionado como diana se degrada específicamente mientras que no se afecta a los ARNm control no relacionados presentes en la misma disolución. El proceso es lo más eficaz con ARNbc con más de 150 pb de longitud. La reacción de degradación específica de ARNbc *in vitro* es probablemente general para muchos, si no todos, los ARNm dado que se observó usando dos genes no relacionados.

La magnitud de los efectos sobre la estabilidad del ARNm *in vitro* descritos en el presente documento son comparables con aquellos notificados *in vivo* (Ngo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95:14687-14692 (1998); Lohmann *et al.*, Dev. Biol., 214:211-214 (1999)). Sin embargo, la reacción *in vitro* requiere un exceso de ARNbc en relación con el ARNm. Por el contrario, unas pocas moléculas de ARNbc por célula pueden inhibir la expresión génica *in vivo* (Fire *et al.*, Nature, 391:806-811 (1998); Kennerdell y Carthew, Cell, 95:1017-1026 (1998)). La diferencia entre la estequiometría del ARNbc que se dirige al ARNm *in vivo* e *in vitro* no debe sorprender porque la mayoría de las reacciones *in vitro* son menos eficaces que sus correspondientes procesos *in vivo*. De manera interesante, la incubación del ARNbc en el lisado potenció en gran medida su actividad para la iARN, indicando que o bien se modifica o bien se asocia con otros factores o ambos. Tal vez un número pequeño de moléculas es eficaz en la inhibición del ARNm seleccionado como diana *in vivo* porque se ha activado el ARNbc inyectado mediante un proceso similar al que se notifica en este caso para la iARN en lisados de *Drosophila*.

ES 2 336 887 T3

Ejemplo 2

ARN bicatenario dirige la ruptura dependiente de ATP del ARNm en intervalos de 21 a 23 nucleótidos

5 Procedimientos y material

iARN in vitro

10 Las reacciones de *iARN in vitro* y la preparación del lisado fueron tal como se describieron en el ejemplo 1 (Tuschl *et al.*, Genes Dev., 13:3191-7 (1999)) excepto porque la reacción contenía creatina quinasa 0,03 g/ml, creatina fosfato 25 μ M (Fluka) y ATP 1 mM. Se disolvía en el momento la creatina fosfato a 500 mM en agua para cada experimento. Se omitió el GTP de las reacciones, excepto en las figuras 2 y 3.

15 Síntesis de ARN

Se sintetizaron los ARNm de Rr-luc y de Pp-luc y los ARNbc de Rr y de Pp (incluyendo el ARNbc "B" en la figura 6) mediante transcripción *in vitro* tal como se describió previamente (Tuschl *et al.*, Genes Dev., 13:3191-7 (1999)). Para generar los moldes de transcripción para el ARNbc "C", el cebador de ARN sentido en 5' era gcgtaatac-
20 gactactataGAACAAAGGAAACGGATGAT (SEC ID NO: 2) y el cebador de ARN sentido en 3' era GAAGAAGT TATTCTCCAAAA (SEC ID NO: 3); el cebador de ARNas en 5' era gcgtaatac gactactataGAAGAAGT TATTCTC CAAAA (SEC ID NO: 4) y el cebador de ARNas en 3' era GAACAAAGGAAACGGATGAT (SEC ID NO: 5). Para el ARNbc "A", el cebador de ARN sentido en 5' era gcgtaatac gactactataGTAGCGCGGTGTATTATACC (SEC ID NO: 6) y el cebador de ARN sentido en 3' era GTACAACGTCAGGTTTACCA (SEC ID NO: 7); el cebador de AR-
25 Nas en 5' era gcgtaatac gactactataGTACAACGTCAGGTTTACCA (SEC ID NO: 8) y el cebador de ARNas en 3' era GTAGCGCGGTGTATTATACC (SEC ID NO: 9) (minúscula, secuencia promotora T7).

Se marcaron en el extremo 5' los ARNm usando guanilil transferasa (Gibco/BRL), S-adenosil metionina (Sigma) y α -³²P-GTP (3000 Ci/mmol; New England Nuclear) según las instrucciones del fabricante. Se purificaron los ARN
30 radiomarcados mediante selección de poli(A) usando el kit Poli(A) Tract III (Promega). Se sintetizaron los ARN con extremos ocupados con adenosina y 7-metil-guanosina no radioactivos en reacciones de transcripción *in vitro* con un exceso de 5 veces de 7-metil-G(5')ppp(5')G o A(5')ppp(5')G en relación con GTP. Se compraron los análogos con ocupación de extremos de New England Biolabs.

35 Agotamiento de ATP e inhibición de síntesis de proteínas

Se agotó el ATP incubando el lisado durante 10 minutos a 25°C con glucosa 2 mM y hexoquinasa 0,1 U/ml (Sigma). Se compraron los inhibidores de síntesis de proteínas de Sigma y se disolvieron en etanol absoluto como disoluciones
40 madre concentradas 250 veces. Las concentraciones finales de los inhibidores en la reacción fueron: anisomicina, 53 mg/ml; cicloheximida, 100 mg/ml; cloranfenicol, 100 mg/ml. Se determinó la síntesis de proteínas relativa midiendo la actividad de la proteína Rr luciferasa producida mediante la traducción del ARNm de Rr-luc en la reacción de *iARN* después de 1 hora tal como se describió previamente (Tuschl *et al.*, Genes Dev., 13:3191-7 (1999)).

45 Análisis del procesamiento de ARNbc

Se incubaron el ARN antisentido de Rr-luc con extremos ocupados con 7-metil-guanosina (501 nt) o los ARNbc marcados con α -³²P-ATP (Pp-luc de 505 pb o Rr-luc de 501) internamente a la concentración final de 5 nM en
50 presencia o ausencia de los ARNm no marcados en el lisado de *Drosophila* durante 2 horas en condiciones estándar. Se detuvieron las reacciones mediante la adición de 2x tampón de proteinasa K y se desproteinizaron tal como se describió previamente (Tuschl *et al.*, Genes Dev., 13:3191-7 (1999)). Se analizaron los productos mediante electroforesis en geles de secuenciación de poliacrilamida al 15% o al 18%. Se generaron patrones de longitud mediante digestión con ARNasa T1 completa de ARNas y ARN sentido de Rr-luc de 501 nt marcado con α -³²P-ATP.

55 Para el análisis de la ruptura de ARNm, se incubó el ARNm radiomarcado con ³²P en 5' (descrito anteriormente) con el ARNbc tal como se describió previamente (Tuschl *et al.*, Genes Dev., 13:3191-7 (1999)) y se analizó mediante electroforesis en geles de secuenciación de poliacrilamida al 5% (figura 5B) y al 6% (figura 6C). Los patrones de longitud incluían patrones de tamaño de ARN disponibles comercialmente (FMC Bioproducts) radiomarcados con guanilil transferasa tal como se describió anteriormente e hidrólisis de bases parcial y marcadores de tamaño molecular de ARNasa T1 generadas a partir de ARNm radiomarcado en 5'.

65 Ensayo de desaminación

Se incubaron ARNbc marcados con α -³²P-ATP internamente (5 nM) en el lisado de *Drosophila* durante 2 horas en condiciones estándar. Tras la desproteinización, se hicieron pasar las muestras en geles de secuenciación al 12% para separar los ARNbc de longitud completa de los productos de 21-23 nt. Se eluyeron los ARN desde los cortes de gel

en NaCl 0,3 M durante la noche, se precipitaron con etanol, se recogieron mediante centrifugación y se redisolviéron en 20 μ l de agua. Se hidrolizó el ARN en nucleósido-5-fosfatos con nucleasa P1 (10 μ l de reacción que contenía 8 μ l de ARN en agua, KOAc 30 mM pH 5,3, ZnSO₄ 10 mM, 10 μ g o 3 unidades de nucleasa P1, 3 horas, 50°C). Se mancharon conjuntamente muestras (1 ml) con 5-mononucleótidos no radioactivos [0,05 unidades D.O. (A₂₆₀) de pA, pC, pG, pI y pU] en placas de celulosa para HPTLC (EM Merck) y se separaron en la primera dimensión en ácido isobutírico/amonio al 25%/agua (66/1/33, v/v/v) y en la segunda dimensión en fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,8/sulfato de amonio/1-propanol (100/60/2, v/p/v; Silberklang *et al*, 1979). Se determinó la migración de los patrones internos no radioactivos mediante sombreado con UV.

10

Resultados y discusión

iARN requiere ATP

15 Tal como se describió en el ejemplo 1, los lisados de embrión de *Drosophila* recapitulan fielmente la iARN (Tuschl *et al.*, Genes Dev., 13:3191-7 (1999)). Anteriormente, se controló el silenciamiento génico mediado por ARNbc midiendo las síntesis de la proteína luciferasa a partir del ARNm seleccionado como diana. Por tanto, estas reacciones de iARN contenían un sistema de regeneración de ATP, necesario para la traducción eficaz del ARNm. Para someter a prueba si el ATP, de hecho, se requería para la iARN, se agotó el ATP de los lisados mediante tratamiento con hexoquinasa y glucosa, que convierte ATP en ADP, y se controló directamente la iARN siguiendo el destino del ARNm de luciferasa de *Renilla reniformis* (Rr-luc) radiomarcado con ³²P (figura 6). El tratamiento con hexoquinasa y glucosa redujo el nivel de ATP endógeno en el lisado desde 250 μ M hasta menos de 10 μ M. La regeneración de ATP requirió tanto creatina fosfato exógena como creatina quinasa, que actúa transfiriendo un fosfato de alta energía desde la creatina fosfatasa hacia el ADP. Cuando se complementaron los extractos agotados en ATP con o bien creatina fosfato o bien creatina quinasa por separado, no se observó ninguna iARN. Por tanto, la iARN requiere ATP *in vitro*. Cuando se añadieron todos juntos ATP, creatina fosfato y creatina quinasa a las reacciones que contenían el lisado agotado en ATP, se reestableció la degradación dependiente de ARNbc del ARNm de Rr-luc (figura 6). No se requería la adición de ATP exógeno para una iARN eficaz en el lisado agotado, siempre que estuvieran presentes tanto creatina fosfato como creatina quinasa, demostrando que la concentración endógena (250 mM) del nucleótido de adenosina es suficiente para soportar la iARN. La iARN con un ARNm de luciferasa de *Photinus pyralis* (Pp-luc) también era dependiente de ATP.

La estabilidad del ARNm de Rr-luc en ausencia de ARNbc de Rr se redujo en los lisados agotados en ATP en relación con la observada cuando se incluía el sistema de regeneración de energía, pero la degradación del ARNm en estas condiciones no presentaba la cinética de degradación rápida característica de la iARN *in vitro*, ni generó los productos de ruptura de ARNm estables característicos de la iARN dirigida por ARNbc. Estos experimentos no establecen si el requisito de ATP para la iARN es directo, implicando ATP en una o más etapas del mecanismo de la iARN, o indirecto, reflejando un papel del ATP en el mantenimiento de altas concentraciones de otro nucleósido trifosfato en el lisado.

40

No se requiere traducción para la iARN in vitro

El requisito de ATP sugería que la iARN podía acoplarse a la traducción de ARNm, un proceso muy dependiente de energía. Para someter a prueba esta posibilidad, se añadieron diversos inhibidores de síntesis de proteínas a la reacción preparando un análisis en gel de agarosa desnaturalizante de ARNm de Pp-luc radiomarcado con ³²P en 5' después de la incubación durante tiempos indicados en una reacción de iARN convencional con y sin inhibidores de síntesis de proteínas. Se sometieron a prueba los inhibidores de traducción eucariota anisomicina, un inhibidor de la formación de enlace peptídico inicial, cicloheximida, un inhibidor de la elongación de la cadena peptídica, y puomicina, un imitador de ARNt que provoca la terminación prematura de la traducción (Cundliffe, Antibiotic Inhibitors of Ribosome Function. En The Molecular Basis of Antibiotic Action, E. Gale, E. Cundliffe, P. Reynolds, M. Richmond y M. Warning, ed. (Nueva York: Wiley), págs. 402-547. (1981)). Cada uno de estos inhibidores redujo la síntesis de proteínas en el lisado de *Drosophila* en más de 1.900 veces (figura 7A). Por el contrario, cloranfenicol, un inhibidor de la síntesis de proteínas mitocondriales de *Drosophila* (Page y Orr-Weaver, Dev. Biol., 183: 195-207 (1997)), no tuvo ningún efecto sobre la traducción en los lisados (figura 7A). A pesar de la presencia de anisomicina, cicloheximida o cloranfenicol, la iARN procedió con una eficacia normal. La puomicina tampoco alteró la iARN eficaz. Por tanto, no se requiere la síntesis de proteínas para la iARN *in vitro*.

La iniciación de la traducción es un proceso dependiente de ATP que implica el reconocimiento de la ocupación de extremos con 7-metilguanosa del ARNm (Kozak, Gene, 234:187-208 (1999); Merrick y Hershey, The Pathway and Mechanism of Eukaryotic Protein Synthesis. En Translational Control, J. Hershey, M. Mathews y N. Sonenberg, ed. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), págs. 31-69 (1996)). El lisado de *Drosophila* usado para soportar la iARN *in vitro* también recapitula la dependencia de ocupación de extremos de la traducción; el ARNm de Pp-luc con una ocupación de extremos con 7-metilguanosa se tradujo de una manera más 10 veces más eficaz que el mismo ARNm con una ocupación de extremos con A(5')ppp(5')G (figura 7B). Ambos ARN eran igualmente estables en el lisado de *Drosophila*, mostrando que esta diferencia en la eficacia no puede explicarse simplemente por una degradación más rápida del ARNm con una ocupación de extremos con adenosina (véase también Gebauer *et al.*, EMBO J., 18:6146-54 (1999)). Aunque la maquinaria de traducción puede discriminar entre los ARNm de Pp-

65

luc con ocupaciones de extremos con 7-metilguanosina y adenosina, los dos ARNm eran igualmente susceptibles a la iARN en presencia del ARNbc de Pp (figura 7C). Estos resultados sugieren que las etapas en el reconocimiento de la ocupación de extremos no están implicadas en la iARN.

5

El ARNbc se procesa para dar especies de 21-23 nt

Se generan ARN de 25 nt de longitud a partir de las cadenas tanto sentido como antisentido de genes que experimentan silenciamiento génico postranscripcional en plantas (Hamilton y Baulcombe, Science, 286:950-2 (1999)). El análisis en gel de acrilamida desnaturizante de los productos formados en una incubación de dos horas del ARNbc con extremos ocupados y los ARNbc radiomarcados con ³²P de manera uniforme en el lisado en condiciones de iARN estándar, en presencia o ausencia de los ARNm diana. Se encontró que el ARNbc se procesaba también para dar pequeños fragmentos de ARN. Cuando se incubaba en el lisado, aproximadamente el 15% de la radioactividad de entrada de tanto el ARNbc de Rr de 501 pb como el ARNbc de Pp de 505 pb apareció en fragmentos de ARN de 21 a 23 nt. Dado que los ARNbc tienen una longitud de más de 500 pb, el rendimiento del 15% de fragmentos implica que se producen múltiples ARN de 21-23 nt de cada molécula de ARNbc de longitud completa. No se detectaron otros productos estables. Se produjeron las especies de ARN pequeñas a partir de los ARNbc en los que se radiomarcaron con ³²P de manera uniforme ambas cadenas. La formación de los ARN de 21-23 nt a partir del ARNbc no requería la presencia del ARNm correspondiente, demostrando que se genera la especie de ARN pequeña mediante el procesamiento del ARNbc, en vez de como producto de la degradación de ARNm dirigida por ARNbc. Se observó que 22 nucleótidos corresponden a dos vueltas de una hélice de ARN-ARN de forma A.

Cuando se incubaron los ARNbc radiomarcados en la cadena o bien sentido o bien antisentido con el lisado en una reacción de iARN convencional, se generaron ARN de 21-23 nt con eficacia comparable. Estos datos apoyan la idea de que los ARN de 21-23 nt se generan mediante procesamiento simétrico del ARNbc. Una variedad de datos apoyan la idea de que el ARN de 21-23 nt se genera eficazmente sólo a partir del ARNbc y no es la consecuencia de una interacción entre ARN monocatenario y el ARNbc. En primer lugar, un ARNbc o ARNbc sentido de Pp-luc de 505 nt radiomarcado con ³²P no se convirtió eficazmente en el producto de 21-23 nt cuando se incubó con ARNbc de Pp de 505 pb no radioactivo 5 nM. En segundo lugar, en ausencia de ARNm, un ARNbc de Rr con extremos ocupados con 7-metilguanosina de 501 nt produjo sólo una cantidad escasamente detectable de ARN de 21-23 nt (los ARN monocatenarios con extremos ocupados son tan estables en el lisado como el ARNbc, Tuschl *et al.*, Genes Dev., 13:3191-7 (1999)), probablemente debido a una pequeña cantidad de ARNbc que contaminaba la preparación antisentido. Sin embargo, cuando se incluyó el ARNm de Rr-luc en la reacción con el ARNbc de Rr con extremos ocupados, radiomarcado con ³²P, se generó una pequeña cantidad de producto de 21-23 nt, que correspondía al 4% de la cantidad del ARN de 21-23 nt producido a partir de una cantidad equimolar de ARNbc de Rr. Es poco probable que este resultado refleje la presencia de ARNbc contaminante en la preparación de ARNbc de Rr, dado que se generó significativamente más producto a partir del ARNbc en presencia del ARNm de Rr-luc que en su ausencia. En cambio, los datos sugieren que el ARNbc puede interactuar con las secuencias de ARNm complementarias para formar ARNbc en la reacción y que el ARNbc resultante se procesa posteriormente para dar las especies de ARN pequeñas. El ARNbc de Rr puede soportar un nivel bajo de la iARN auténtica *in vitro* (véase a continuación), consistente con esta explicación.

Se preguntó después si la producción de los ARN de 21-23 nt a partir del ARNbc requería ATP. Cuando se incubó el ARNbc de Pp de 505 pb en un lisado agotado en ATP mediante el tratamiento con hexoquinasa y glucosa, se produjo ARN de 21-23 nt, aunque 6 veces más lento que cuando se regeneró el ATP en el lisado agotado mediante la inclusión de creatina quinasa y creatina fosfato. Por tanto, puede no requerirse ATP para la producción de las especies de ARN de 21-23 nt, pero por el contrario puede simplemente potenciar su formación. Como alternativa, puede requerirse el ATP para el procesamiento del ARNbc, pero a una concentración menor que a la que permanece tras el tratamiento con hexoquinasa. No se entiende la base molecular para la movilidad más lenta de los fragmentos de ARN pequeños generados en el lisado agotado en ATP.

Wagner y Sun (Wagner y Sun, Nature, 391:744-745 (1998)) y Sharp (Sharp, Genes Dev., 13:139-41 (1999)) han especulado que el requisito de ARNbc en el silenciamiento génico por la iARN refleja la participación de una adenosina desaminasa específica de ARNbc en el proceso. Las adenosina desaminasas de ARNbc desenrollan el ARNbc convirtiendo la adenosina en inosina, que no se aparea con uracilo. Las adenosina desaminasas de ARNbc funcionan en la edición postranscripcional de ARNm (para revisión véase Bass, Trends Biochem. Sci., 22:157-62 (1997)). Para someter a prueba la participación de una adenosina desaminasa de ARNbc en la iARN, se examinó el grado de conversión de adenosina en inosina en los ARNbc de Pp-luc de 505 pb y de Rr-luc de 501 pb tras la incubación con lisado de embrión de *Drosophila* en una reacción de iARN *in vitro* convencional. Se evaluó la desaminación de adenosina en el ARNbc de longitud completa y las especies de ARN de 21-23 nt mediante cromatografía en capa fina bidimensional. Se produjo fosfato inorgánico (Pi.) mediante la degradación de mononucleótidos por fosfatasa que contaminan la nucleasa P1 disponible comercialmente (Auxilien *et al.*, J. Mol. Biol., 262:437-458 (1996)). También se determinó el grado de desaminación de adenosina en las especies de 21-23 nt. Se incubó el ARNbc de longitud completa radiomarcado con [³²P]-adenosina en el lisado, y tanto el ARNbc de longitud completa como los productos de ARN de 21-23 nt se purificaron a partir de un gel de acrilamida desnaturizante, se rompieron en mononucleótidos con nucleasa P1 y se analizaron mediante cromatografía en capa fina bidimensional.

Una fracción significativa de las adenosinas en el ARNbc de longitud completa se convirtieron en inosina después de 2 horas (el 3,1% y el 5,6% de conversión para los ARNbc de Pp-luc y de Rr-luc, respectivamente). Por el contrario, se desaminó sólo el 0,4% (ARNbc de Pp) o el 0,7% (ARNbc de Rr) de las adenosinas en las especies de 21-23 nt. Estos datos implican que menos de 1 de 27 moléculas de las especies de ARN de 21-23 nt contienen una inosina. Por tanto, es poco probable que se requiera para su producción, la desaminación de adenosina dependiente de ARNbc en las especies de 21-23 nt. El ARNbc genera una pequeña cantidad de iARN *in vitro*.

Cuando se radiomarcó con ^{32}P el ARNm en la ocupación de extremos con 7-metilguanosa en 5', se acumularon productos de degradación en 5' estables durante la reacción de iARN. Tales productos de degradación en 5' estables se observaron para los ARNm tanto de Pp-luc como de Rr-luc cuando se incubaron con sus ARNbc análogos. Previamente, se notificó que no se produce una iARN eficaz cuando se usa el ARNbc en lugar del ARNbc (Tuschl *et al.*, Genes Dev., 13:3191-7 (1999)). No obstante, el ARNm era perceptiblemente menos estable cuando se incubaba con ARNbc que con tampón (figuras 8A y 8B). Esto era particularmente evidente para el ARNm de Rr-luc: aproximadamente el 90% del ARN permaneció intacto tras una incubación de 3 horas en el lisado, pero sólo el 50% cuando se añadió el ARNbc. Menos del 5% permaneció cuando se añadió el ARNbc. De manera interesante, la disminución en la estabilidad del ARNm provocada por ARNbc iba acompañada de la formación de una pequeña cantidad de los productos de degradación en 5' estables característicos de la reacción de iARN con ARNbc. Este hallazgo compara la observación de que una pequeña cantidad de producto de 21-23 nt se formaba a partir del ARNbc cuando se incubaba con el ARNm (véase anteriormente) y refuerza la idea de que el ARNbc puede ingresar a la ruta de la iARN, aunque ineficazmente.

Los sitios de ruptura de ARNm se determinan mediante la secuencia del ARNbc

Se examinaron los sitios de ruptura de ARNm usando tres ARNbc diferentes, "A", "B" y "C", desplazados a lo largo de la secuencia de Rr-luc en aproximadamente 100 nt. Se realizó el análisis en gel de acrilamida desnaturante de los productos de ruptura en 5', estables producidos tras la incubación del ARNm de Rr-luc durante los tiempos indicados con cada uno de los tres ARNbc, "A", "B" y "C", o con tampón (\emptyset). Las posiciones de éstos en relación con la secuencia de ARNm de Rr-luc se muestran en la figura 9. Cada uno de los tres ARNbc se incubó en una reacción de iARN convencional con ARNm de Rr-luc radiomarcado con ^{32}P en la ocupación de extremos en 5'. En ausencia de ARNbc, no se detectaron productos de ruptura en 5' estables para el ARNm, incluso después de 3 horas de incubación en el lisado. Por el contrario, después de una incubación de 20 minutos, cada uno de los tres ARNbc produjo un marcador de tamaño molecular de bandas correspondientes a un conjunto de productos de ruptura de ARNm característicos para aquel ARNbc particular. Para cada ARNbc, los productos de ruptura de ARNm en 5', estables se restringieron a la región del ARNm de Rr-luc que correspondía al ARNbc (figuras 9 y 10). Para el ARNbc "A", las longitudes de los productos de ruptura en 5' oscilaban desde 236 hasta poco menos de ~750 nt; el ARNbc "A" abarca los nucleótidos 233 a 729 del ARNm de Rr-luc. La incubación del ARNm con el ARNbc "B" produjo productos de ruptura en 5' de ARNm que oscilaban en longitud desde 150 hasta ~600 nt; el ARNbc "B" abarca los nucleótidos 143 a 644 del ARNm. Finalmente, el ARNbc "C" produjo productos de ruptura de ARNm desde 66 hasta ~500 nt de longitud. Este ARNbc abarca los nucleótidos 50 a 569 del ARNm de Rr-luc. Por tanto, el ARNbc proporciona no sólo especificidad para la reacción de iARN, seleccionando qué ARNm del conjunto de ARNm celular total se degradará, sino también determina las posiciones precisas de ruptura a lo largo de la secuencia de ARNm.

El ARNm se rompe a intervalos de 21-23 nucleótidos

Para obtener una visión adicional del mecanismo de la iARN, se mapearon las posiciones de varios sitios de ruptura de ARNm para cada uno de los tres ARNbc (figura 10). Se realizó un análisis en gel de acrilamida desnaturante de alta resolución de un subconjunto de los productos de ruptura en 5' descritos anteriormente. Notablemente, la mayoría de las rupturas se produjeron a intervalos de 21-23 nt (figura 10). Este espaciado es especialmente notable a la luz de la observación que el ARNbc se procesa para dar una especie de ARN de 21-23 nt y el hallazgo de Hamilton y Baulcombe de que un ARN de 25 nt se correlaciona con el silenciamiento génico postranscripcional en plantas (Hamilton y Baulcombe, Science, 286:950-2 (1999)). De los 16 sitios de ruptura que se mapearon (2 para ARNbc "A", 5 para ARNbc "B" y 9 para ARNbc "C"), todos excepto dos reflejan el intervalo de 21-23 nt. Una de las dos rupturas excepcionales era un sitio de ruptura débil producido por ARNbc "C" (indicado mediante un círculo azul no sombreado en la figura 10). Esta ruptura se produjo a 32 nt en 5' del siguiente sitio de ruptura. La otra excepción es particularmente intrigante. Tras cuatro rupturas espaciadas separadas por 21-23 nt, ARNbc "C" provocó la ruptura del ARNm a sólo nueve nt en 3' del sitio de ruptura anterior (punta de fecha roja en la figura 10). Esta ruptura se produjo en una serie de siete residuos de uracilo y parece que "reajusta" la regla para la ruptura; el siguiente sitio de ruptura era a 21-23 nt en 3' del sitio excepcional. Los tres sitios de ruptura posteriores que se mapearon estaban también separados por 21-23 nt. Curiosamente, de los dieciséis sitios de ruptura provocados por los tres ARNbc diferentes, catorce se producen en residuos de uracilo. La importancia de este hallazgo no se entiende, pero sugiere que la ruptura de ARNm se determina mediante un proceso que mide intervalos de 21-23 nt y que tiene una preferencia de secuencia para la ruptura en uracilo. Los resultados muestran que las especies de ARN de 21-23 nt producidas mediante incubación de ARNbc de ~500 pb en el lisado provocaban interferencia específica de secuencias *in vitro* cuando se aislaban a partir de gel de acrilamida y se añadían a una nueva reacción de iARN en lugar del ARNbc de longitud completa.

Un modelo para ruptura de ARNm dirigida por ARNbc

Sin querer quedar adherido a la teoría, los datos bioquímicos descritos en el presente documento, junto con experimentos genéticos recientes en *C. elegans* y *Neurospora* (Cogoni y Macino, Nature, 399:166-9 (1999); Grishok *et al.*, Science, 287:2494-7 (2000); Ketting *et al.*, Cell, 99:133-41(1999); Tabara *et al.*, Cell, 99:123-32 (1999)); sugieren un modelo de cómo el ARNbc se dirige al ARNm para su destrucción (figura 11). En este modelo, se rompe en primer lugar el ARNbc en fragmentos de 21-23 nt de longitud en un proceso que es probable que implique genes tales como los loci rde-1 y rde-4 de *C. elegans*. Los fragmentos resultantes, probablemente como ARNs cortos unidos por proteínas específicas de iARN, se aparearán entonces con el ARNm y reclutarán una nucleasa que rompe el ARNm. Como alternativa, podía producirse intercambio de cadenas en un complejo proteína-ARN que mantenía transitoriamente un fragmento de ARNbc de 21-23 nt cerca del ARNm. La separación de las dos cadenas del ARNbc tras la fragmentación puede asistirse mediante una helicasa de ARN dependiente de ATP, que explica el aumento de ATP observado de la producción de ARN de 21-23 nt.

Es probable que cada pequeño fragmento de ARN produzca una, o como máximo dos, rupturas en el ARNm, quizás en los extremos 5' o 3' del fragmento de 21-23 nt. Los ARN pequeños pueden amplificarse mediante una ARN polimerasa dirigida por ARN tal como la codificada por el gen ego-1 de *C. elegans* (Smardon *et al.*, Current Biology, 10:169-178 (2000)) o el gen qde-1 en *Neurospora* (Cogoni y Macino, Nature, 399:166-9 (1999), produciendo silenciamiento génico postranscripcional de larga duración en ausencia del ARNbc que iniciaba el efecto de la iARN. La iARN heredable en *C. elegans* requiere que se inicien los genes rde-1 y rde-4, pero que no persistan en las generaciones posteriores. Los genes rde-2, rde-3 y mut-7 de *C. elegans* se requieren en el tejido en el que se produce la iARN, pero no se requieren para la iniciación de la iARN heredable (Grishok *et al.*, Science, en prensa 2000). Es probable que estos genes "efectores" (Grishok *et al.*, Science, en prensa 2000) codifiquen proteínas que funcionan en la selección real de dianas de ARNm y en su ruptura posterior. El ATP puede requerirse en cualquiera de varias etapas durante la iARN, incluyendo la formación de complejos en el ARNbc, la disociación de cadenas durante o después de la ruptura del ARNbc, el apareamiento de los ARN de 21-23 nt con el ARNm diana, la ruptura del ARNm y el reciclado de los complejos de selección como diana. Someter a prueba estas ideas con el sistema de iARN *in vitro* será un reto importante en el futuro. Algunos genes implicados en la iARN también son importantes para la cosupresión y el silenciamiento de transposones. La cosupresión es un fenómeno biológico amplio que abarca plantas, insectos y quizás seres humanos. El mecanismo más probable en *Drosophila melanogaster* es el silenciamiento transcripcional (Pal-Bhanra *et al.*, Cell 99: 35-36). Por tanto, es probable que los fragmentos de 21-23 nt estén implicados en el control transcripcional, así como en el control postranscripcional.

Ejemplo 3

Los 21-23-meros aislados provocaron interferencia específica de secuencia cuando se añadieron a una reacción de iARN nueva

Aislamiento de los fragmentos de 21-23 nt a partir de la reacción de incubación de ARNbc de 500 pb en el lisado

Se incubó ARN bicatenario (de 500 pb) a una concentración de 10 nM en lisado de embrión de *Drosophila* durante 3 h a 25°C en condiciones estándar tal como se describe en el presente documento. Tras la desproteínización de la muestra, se separaron los productos de reacción de 21-23 nt del ARNbc sin procesar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (15%) desnaturalizante. Para la detección de los fragmentos de 21-23 nt no radiomarcados, se cargó una reacción de incubación con ARNbc radiomarcado en un carril separado del mismo gel. Se cortaron los cortes de gel que contenían los fragmentos de 21-23 nt no radiomarcados y se eluyeron los fragmentos de 21-23 nt desde los cortes de gel a 4°C durante la noche en 0,4 ml de NaCl 0,3 M. Se recuperó el ARN del sobrenadante mediante precipitación con etanol y centrifugación. Se disolvió el sedimento de ARN en 10 µl de tampón de lisis. Como control, también se cortaron cortes de gel ligeramente por encima y por debajo de la banda de 21-23 nt y se sometieron a los mismos procedimientos de elución y precipitación. También, se cortó y eluyó un ARNbc sin incubar cargado en el gel al 15% y un corte de gel correspondiente a los fragmentos de 21-23 nt. Se disolvieron todos los sedimentos de los experimentos control en 10 µl de tampón de lisis. Las pérdidas de ARN durante la recuperación desde los cortes de gel mediante elución son aproximadamente del 50%.

Incubación de los fragmentos de 21-23 nt purificados en un ensayo de iARN basado en traducción

Se usó 1 µl de la disolución de ARN control o 21-23-mero eluido para una reacción de incubación de iARN de 10 µl convencional (véase anteriormente). Se incubaron previamente los 21-23-meros en el lisado que contenía la mezcla de reacción durante 10 ó 30 min antes de la adición del ARNm diana y control. Durante la incubación previa, las proteínas implicadas en la interferencia de ARN pueden reasociarse con los 21-23-meros debido a una señal específica presente en estos ARN. Se continuó con la incubación durante otra hora para permitir la traducción de los ARN diana y control. Se extinguió la reacción mediante la adición de tampón de lisis pasiva (Promega), y se midió la actividad luciferasa. Se expresa la interferencia por ARN como la proporción de actividad luciferasa diana con respecto a control normalizada mediante un control de tampón libre de ARN. Se observó la supresión específica del gen diana con incubación previa de o bien 10 minutos o bien 30 minutos. La supresión era reproducible y redujo la proporción relativa de diana con respecto a control en 2-3 veces. Ninguno de los fragmentos de ARN

aislados como controles mostró interferencia específica. Para comparar, la incubación de ARNbc de 500 pb 5nM (incubación previa de 10 minutos) afecta a la proporción relativa de gen control con respecto a diana aproximadamente 30 veces.

5

Estabilidad de los fragmentos de 21-23 nt aislados en una reacción de incubación de lisado nueva

De manera consistente con la observación de la iARN mediada por un fragmento de ARN de 21-23 nt purificado, se encontró que el 35% del ARN de 21-23 nt de entrada persiste durante más de 3 h en una reacción de incubación de este tipo. Esto sugiere que factores celulares se asocian con los fragmentos de 21-23 nt desproteinizados y reconstituyen una partícula de degradación de ARNm funcional. Es probable que las señales en relación con estos fragmentos de 21-23 nt, o sus longitudes específicas o naturaleza bicatenaria posibles sean responsables de esta observación. Los fragmentos de 21-23 nt tienen un grupo hidroxilo en 3' terminal, tal como se evidencia por la movilidad alterada en un gel de secuenciación tras tratamiento con peróxido y eliminación beta.

15

Ejemplo 4

21-23-meros purificados mediante procedimientos no desnaturalizantes provocaron interferencia específica de secuencias cuando se añadieron a una reacción de iARN nueva

20

Se incubó ARN bicatenario (ARNbc de Rr-luc de 501 pb, tal como se describió en el ejemplo 1) cincuenta nanomolar en un 1 ml de reacción *in vitro* con lisado a 25°C (véase el ejemplo 1). Se detuvo después la reacción mediante la adición de un volumen igual de 2x tampón PK (véase el ejemplo 1) y se añadió proteinasa K hasta una concentración final de 1,8 µg/µl. Se incubó la reacción durante 1 h adicional a 25°C, se extrajo con fenol y se precipitaron después los ARN con 3 volúmenes de etanol. Se recogió el precipitado obtenido con etanol mediante centrifugación y se resuspendió el sedimento en 100 µl de tampón de lisis y se aplicó a un pase de columna de filtración en gel 10/30 Superdex HR 200 (Pharmacia) en tampón de lisis a 0,75 ml/min. Se recogieron fracciones de 200 µl de la columna. Se añadieron veinte µl de acetato de sodio 3 M y 20 µg de glucógeno a cada fracción, y se recuperó el ARN mediante precipitación con 3 volúmenes de etanol. Se resuspendieron los precipitados en 30 µl de tampón de lisis. Los perfiles de la columna tras el fraccionamiento de ARN de entrada marcado con ³²P se muestran en la figura 13A.

25

Se sometió a prueba un microlitro de cada fracción resuspendida en una reacción de iARN *in vitro* convencional de 10 µl (véase el ejemplo 1). Este procedimiento produce una concentración de ARN en la reacción de iARN *in vitro* que es aproximadamente igual a la concentración de aquella especie de ARN en la reacción original antes de la carga en la columna. Se incubaron previamente las fracciones en el lisado que contenía la mezcla de reacción durante 30 min antes de la adición de ARNm diana de Rr-luc 10 nM y ARNm control de Pp-luc 10 nM. Durante la incubación previa, las proteínas implicadas en la interferencia por ARN pueden reasociarse con los 21-23-meros debido a una señal específica presente en estos ARN. Se continuó con la incubación durante otras tres horas para permitir la traducción de los ARNm diana y control. Se extinguió la reacción mediante la adición de tampón de lisis pasiva (Promega) y se midió la actividad luciferasa. La supresión de la expresión diana de ARNm de Rr-luc por los fragmentos de 21-23 nt purificados era reproducible y redujo la proporción relativa de diana con respecto a control en > 30 veces, una cantidad comparable con un control de ARNbc de 500 pb 50 nM. La supresión de la expresión de ARNm diana era específica: se observó poco o ningún efecto sobre la expresión del control de ARNm de Pp-luc.

30

Los datos muestran que ambas fracciones que contienen ARNbc sin romper (fracciones 3-5) o ARNbc parcialmente roto, largo (fracciones 7-13) y las fracciones que contienen los ARNip de 21-23 nt procesados completamente (fracciones 41-50) median en la interferencia por ARN eficaz *in vitro* (figura 13B). La supresión de la expresión de ARNm diana era específica: se observó poco o ningún efecto sobre la expresión del control de ARNm de Pp-luc (figura 13C). Estos datos, junto con aquellos en los primeros ejemplos, demuestran que los ARNip de 21-23 nt son (1) verdaderos productos intermedios en la ruta de la iARN y (2) mediadores eficaces de la interferencia por ARN *in vitro*.

35

Ejemplo 5

55

Los ARNip dúplex de 21 nucleótidos median en la interferencia por ARN en cultivos tisulares humanos

Procedimientos

60

Preparación de ARN

Se sintetizaron químicamente ARN de 21 nt usando timidina fosforamídita y fosforamíditas de ARN Expedite (Prologo, Alemania). Se desproteccionaron y purificaron en gel los oligonucleótidos sintéticos (Elbashir, S. M., Lendeckel, W. y Tuschl, T., *Genes. & Dev.* 15, 188-200 (2001)), seguido por purificación con cartucho Sep-Pak C18 (Waters, Milford, MA, EE.UU.) (Tuschl, t., *et al.*, *Biochemistry*, 32: 11658-11668 (1993)). Las secuencias de ARNip que se dirigen a luciferasa de GL2 (Acc. X65324) y de GL3 (Acc. U47296) correspondieron a las regiones codificantes 153-173 en relación con el primer nucleótido del codón de inicio, los ARNip que se dirigen a RL (Acc. AF025846) correspondían a la región 119-129 después del codón de inicio. Se transcribieron los ARN más largos con polimerasa

65

de ARN T7 a partir de los productos de PCR, seguido por purificación en Sep-Pak y en gel. Los ARNbc de GL2 o GL3 de 49 y 484 pb correspondían a la posición 113-161 y 113-596, respectivamente, en relación con el inicio de la traducción; los ARNbc de RL de 50 y 501 pb correspondían a la posición 118-167 y 118-618, respectivamente. Se amplificaron los moldes de PCR para síntesis del ARNbc que se dirigía a GFP humanizada (hG) a partir de pAD3 (Kehlenbach, R. H., *et al.*, J. Cell Biol., 141:863-874 (1998)), mediante lo cual el ARNbc de hG de 50 y 501 pb correspondían a la posición 118-167 y 118-618, respectivamente, para el codón de iniciación.

Para la reasociación de los ARNip, se incubaron 20 μM de cadenas sencillas en tampón de reasociación (acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM a pH 7,4, acetato de magnesio 2 mM) durante 1 min a 90°C seguido por 1 h a 37°C. Se prolongó durante la noche la etapa de incubación a 37°C para los ARNbc de 50 y 500 pb, y se realizaron estas reacciones de reasociación a concentraciones de cadena de 8,4 μM y 0,84 μM , respectivamente.

Cultivo celular

Se propagaron células S2 en medio para *Drosophila* de Schneider (Life Technologies) complementado con FBS al 10%, penicilina 100 unidades/ml y estreptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 25°C. Se hicieron crecer células 293, NIH/3T3, HeLa S3, COS-7 a 37°C en medio de Eagle modificado por Dulbecco complementado con FBS al 10%, penicilina 100 unidades/ml y estreptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se hicieron pases regularmente de células para mantener un crecimiento exponencial. 24 h antes de la transfección a una confluencia de aproximadamente el 80%, se tripsinizaron células de mamífero y se diluyeron 1:5 con medio recién preparado sin antibióticos ($1-3 \times 10^5$ células/ml) y se transfirieron a placas de 24 pocillos (500 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$). No se tripsinizaron las células S2 antes de la división. Se llevó a cabo la transfección con reactivo Lipofectamine 2000 (Life Technologies) tal como describe el fabricante para líneas celulares adherentes. Por pocillo, se aplicaron 1,0 μg de pGL2-Control (Promega) o pGL3-Control (Promega), 0,1 μg de pRL-TK (Promega) y 0,28 μg de ARNbc o ARNip dúplex, formulados en liposomas; el volumen final era de 600 μl por pocillo. Se incubaron las células 20 h tras la transfección y parecieron sanas después de eso. Se controló posteriormente la expresión de luciferasa con el ensayo de luciferasa dual (Promega). Se determinaron las eficacias de transfección mediante microscopía de fluorescencia para las líneas celulares de mamífero tras la cotransfección de 1,1 μg de pAD3²² que codifica hGFP y 0,28 μg de ARNip de GL2inv y eran del 70-90%. Se amplificaron los plásmidos indicadores en XL-1 Blue (Stratagene) y se purificaron usando el kit EndoFree Maxi Plasmid de Qiagen.

Resultados

La interferencia por ARN (iARN) es el proceso de silenciamiento génico postranscripcional, específico de secuencias, en animales y plantas, iniciado por ARN bicatenario (ARNbc) homólogo en secuencia al gen silenciado (Fire, A., Trends Genet., 15: 358-363 (1999); Sharp, P. A. y Zamore, P. D., Science, 287:2431-2433 (2000); Sijen, T. y Kooter, J. M., Bioessays, 22:520-531 (2000); Bass, B. L., Cell, 101:235-238 (2000); Hammond, S. M., *et al.*, Nat. Rev. Genet., 2:110-119 (2001)). Los mediadores de la degradación de ARNm específica de secuencias son los ARN de interferencia pequeña (ARNip) de 21 y 22 nt generados por ruptura con ARNasa III a partir de ARNbc⁶⁻¹⁰ más largos (Hamilton, A. J. y Baulcombe, D. C., Science, 286:950-952 (1999); Hammond, S. M., *et al.*, Nature, 404:293-296 (2000); Zamore, P. D., *et al.*, Cell, 101:25-33 (2000); Bernstein, E., *et al.*, Nature, 409:363-366 (2001); Elbashir, S. M., *et al.*, Genes & Dev., 15:188-200 (2001). Tal como se muestra en el presente documento, los ARNip dúplex de 21 nt pueden suprimir específicamente la expresión de gen indicador en cultivos tisulares de mamífero múltiples, incluyendo células HeLa y de riñón de embrión humano (293). A diferencia de los ARNbc de 50 pb o 500 pb, los ARNip no activan la respuesta de interferón. Estos resultados indican que los ARNip dúplex son una herramienta general para la inactivación específica de secuencias de la función génica en células de mamífero.

Los ARNip de 21 y 22 nt apareados con extremos 3' protuberantes median en la degradación de ARNm específica de secuencias eficaz en lisados preparados a partir de embriones de *D. melanogaster* (Elbashir, S. M., *et al.*, Genes & Dev., 15:188-200 (2001). Para someter a prueba si los ARNip también pueden mediar en la iARN en cultivo tisular, se construyeron ARNip dúplex de 21 nt con protuberancias en 3' de 2 nt simétricos dirigidos contra genes indicadores que codifican luciferasas de pensamiento de mar (*Renilla reniformis*) y dos variantes de secuencia de libélula (*Photinus pyralis*, GL2 y GL3) (figuras 14A, 14B). Se cotransfectaron los ARNip dúplex con las combinaciones de plásmidos indicadores pGL2/pRL o pGL3/pRL, en células S2 de Schneider de *D. melanogaster* o células de mamífero usando liposomas catiónicos. Se determinaron las actividades luciferasa 20 h después de la transfección. En todas las líneas celulares sometidas a prueba, se observó reducción específica de la expresión de los genes indicadores en presencia de ARNip dúplex análogo (figuras 15A-15J). Notablemente, los niveles de expresión de luciferasa absolutos no se vieron afectados por los ARNip no afines, indicando la ausencia de efectos secundarios dañinos por los ARN dúplex de 21 nt (por ejemplo las figuras 16A-16D, para células HeLa). En las células S2 de *D. melanogaster* (figura 15A, 15B), la inhibición específica de las luciferasas fue completa, y similar a resultados obtenidos previamente para ARNbc más largos (Hammond, S. M., *et al.*, Nature, 404: 293-296 (2000); Caplen, N.J., *et al.*, Gene, 252:95-105 (2000); Clemens, M y Williams, B., Cell, 13:565-572 (1978); Ui-Tei, K., *et al.*, FEBS Letters, 479:79-82 (2000)). En células de mamífero, en las que los genes indicadores se expresaron de 50 a 100 veces más fuerte, la supresión específica fue menos completa (figuras 15C-15J). Se redujo la expresión de GL2 de 3 a 12 veces, la expresión de GL3 de 9 a 25 veces y la expresión de RL de 1 a 3 veces, en respuesta a los ARNip análogos. Para las células 293, el transporte dirigido de luciferasa de RL por los ARNip de RL fue ineficaz, aunque las dianas de GL2 y GL3 respondieron específicamente (figuras 15I, 15J). Es probable que la falta de reducción de expresión de RL en células 293 se deba a la expresión

de 5 a 20 veces mayor en comparación con cualquier otra línea celular de mamífero sometida a prueba y/o a una accesibilidad limitada de la secuencia diana debido a la estructura secundaria del ARN o las proteínas asociadas. No obstante, el transporte dirigido específico de la luciferasa de GL2 y GL3 por los ARNip dúplex análogos indicaba que la iARN también funciona en células 293.

5 La protuberancia en 3' de 2 nt en todos los ARNip dúplex, excepto para GL2u, estaba compuesto de (2'-desoxi) timidina. La sustitución de uridina por timidina en la protuberancia en 3' se toleró bien en el sistema *in vitro* de *D. melanogaster*, y la secuencia de la protuberancia no fue crítica para el reconocimiento de dianas (Elbashir, S. M., *et al.*, Genes & Dev., 15:188-200 (2001)). Se eligió la protuberancia de timidina, porque se supone que potencia la
10 resistencia a nucleasa de los ARNip en el medio de cultivo tisular y en las células transfectadas. En efecto, el ARNip de GL2 modificado con timidina fue ligeramente más potente que el ARNip de GL2u sin modificar en todas las líneas celulares sometidas a prueba (figuras 15A, 15C, 15E, 15G, 15I). Es concebible que modificaciones adicionales de los nucleótidos protuberantes en 3' proporcionarán beneficios adicionales al suministro y la estabilidad de los ARNip dúplex.

15 En experimentos de cotransfección, se usaron ARNip dúplex 25 nM con respecto al volumen final del medio de cultivo tisular (figuras 15A-15J, 16A-16F). El incremento de la concentración de ARNip hasta 100 nM no potenció los efectos de silenciamiento específico, pero comenzó a afectar a las eficacias de transfección debido a la competencia por la encapsulación de liposomas entre el ARNip y el ADN de plásmido. La disminución de la concentración de
20 ARNip hasta 1,5 nM no redujo el efecto de silenciamiento específico, aunque los ARNip estaban ahora sólo de 2 a 10 veces más concentrados que los plásmidos de ADN. Esto indica que los ARNip son reactivos extraordinariamente poderosos para mediar en el silenciamiento génico, y que los ARNip son eficaces a concentraciones que están varias órdenes de magnitud por debajo de las concentraciones aplicadas en experimentos de transporte dirigido a gen de ribozima o antisentido convencionales.

25 Con el fin de controlar el efecto de ARNbc más largos en células de mamífero, se prepararon los ARNbc de 50 y 500 pb análogos a los genes indicadores. Como control no específico, se usaron los ARNbc de GFP humanizada (hG) (Kehlenbach, R. H., *et al.*, J. Cell Biol., 141:863-874 (1998)). Cuando se cotransfectaron los ARNbc, en cantidades idénticas (no concentraciones) a los ARNip dúplex, se redujo de manera fuerte y no específica la expresión del gen
30 indicador. Se ilustra este efecto para las células HeLa como ejemplo representativo (figuras 16A-16D). Las actividades absolutas de luciferasa disminuyeron de manera no específica de 10 a 20 veces por la cotransfección de ARNbc de 50 pb y de 20 a 200 veces por la de ARNbc de 500 pb, respectivamente. Se observaron efectos no específicos similares para células NIH/3T3 y COS-7. Para células 293, se observó una reducción no específica de 10 a 20 veces sólo para los ARNbc de 500 pb. Se esperaba una reducción no específica en la expresión del gen indicador por ARNbc > 30
35 pb como parte de la respuesta de interferón (Matthews, M., Interactions between viruses and the cellular machinery for protein synthesis in Translational Control (editores, Hershey, J., Matthews, M. y Sonenberg, N.) 505-548 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY; 1996); Kumar, M y Carmichael, G.G., Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62:1415-1434 (1998); Stark, G.R. *et al.*, Annu. Rev. Biochem., 67:227-264 (1998)). Sorprendentemente, a pesar de la fuerte disminución no específica en la expresión del gen indicador, se detectó de manera reproducible silenciamiento
40 mediado por ARNbc, específico de secuencias adicional. Sin embargo, los efectos de silenciamiento específico, eran sólo evidentes cuando se normalizaban las actividades relativas del gen indicador a los controles de ARNbc de hG (figuras 16E, 16F). Se observó una reducción específica de 2 a 10 veces en respuesta a ARNbc análogo, también en las otras tres líneas celulares de mamífero sometidas a prueba. Se notificaron previamente efectos de silenciamiento específico con los ARNbc (356-1662 pb) en células CHO-K1, pero las cantidades de ARNbc requeridas para detectar
45 una reducción específica de 2 a 4 veces eran aproximadamente 20 veces mayores que en nuestros experimentos (Ui-Tei, K., *et al.*, FEBS Letters, 479:79-82 (2000)). También, las células CHO-K1 parecen que son deficientes en la respuesta de interferón. En otro informe, se sometieron a prueba células 293, NIH/3T3 y BHK-21 para determinar la iARN usando combinaciones de luciferasa/indicador lacZ, y ARNbc de GFP no específico de 717 pb y de lacZ específico de 829 pb (Caplen, N.J., *et al.*, Gene, 252:95-105 (2000)). El fallo de detección de iARN en este caso es
50 probable que se deba al ensayo de luciferasa/indicador lacZ menos sensible y las diferencias de longitud del ARNbc diana y control. En su conjunto, los resultados descritos en el presente documento indican que la iARN es activa en células de mamífero, pero que el efecto de silenciamiento es difícil de detectar si se activa el sistema de interferón por ARNbc > 30 pb.

55 El mecanismo del proceso de interferencia mediada por ARNip de 21 nt en células de mamífero sigue sin revelarse, y el silenciamiento puede producirse de manera postranscripcional y/o transcripcional. En el lisado de *D. melanogaster*, los ARNip dúplex median en el silenciamiento génico postranscripcional mediante la reconstitución de complejos de ARNip-proteína (los PRNip), que guían la ruptura dirigida y el reconocimiento de ARNm (Hammond, S. M., *et al.*, Nature, 404:293-296 (2000); Zamore, P. D., *et al.*, Cell, 101:25-33 (2000); Elbashir, S. M., *et al.*, Genes & Dev.,
60 15:188-200 (2001)). En las plantas, el silenciamiento postranscripcional mediado por ARNbc también se ha relacionado con la metilación del ADN dirigida por ARN, que puede dirigirse también por los ARNip de 21 nt (Wassenegger, M., Plant Mol. Biol., 43:203-220 (2000); Finnegan, E.J., *et al.*, Curr. Biol., 11:R99-R102 (2000)). La metilación de las regiones promotoras puede conducir al silenciamiento transcripcional (Metter, M.F., *et al.*, EMBO J., 19:5194-5201 (2000)), pero la metilación en las secuencias codificantes no debe (Wang, M.-B., RNA, 7:16-28 (2001)). La metilación
65 del ADN y el silenciamiento transcripcional en mamíferos son procesos bien documentados (Kass, S.U., *et al.*, Trends Genet., 13:444-449 (1997); Razin, A., EMBO J., 17:4905-4908 (1998)), aunque todavía no se han relacionado con el silenciamiento postranscripcional. La metilación en mamíferos se dirige predominantemente hacia residuos de CpG. Dado que no hay ningún CpG en el ARNip de RL, aunque el ARNip de RL media en el silenciamiento específico en

ES 2 336 887 T3

cultivo tisular de mamífero, es poco probable que la metilación del ADN sea crítica para nuestro proceso de silenciamiento observado. En resumen, en el presente documento se describe el silenciamiento génico mediado por ARNip en células de mamífero. El uso de los ARNip de 21 nt es muy prometedor para la inactivación de la función génica en un cultivo tisular humano y el desarrollo de terapias específicas de genes.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir ARN bicatenario desde 21 hasta 23 nucleótidos de longitud que comprende:

- (a) combinar ARN bicatenario con un extracto soluble que media en la interferencia por ARN, produciendo de este modo una combinación; y
- (b) mantener la combinación de (a) en condiciones en las que el ARN bicatenario se procesa para dar ARN bicatenario desde 21 hasta 23 nucleótidos de longitud.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además aislar el ARN bicatenario desde 21 hasta 23 nucleótidos de longitud a partir de la combinación.

3. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el ARN bicatenario corresponde a una secuencia de un gen que va a degradarse; y el ARN desde 21 hasta 23 nucleótidos de longitud media en la interferencia por ARN de ARNm del gen que va a degradarse, produciendo de este modo ARN bicatenario desde 21 hasta 23 nucleótidos de longitud que media en la interferencia por ARN del ARNm del gen.

4. Un procedimiento para mediar en la interferencia por ARN de ARNm de un gen en una célula o un organismo no humano que comprende:

- (a) introducir ARN bicatenario desde 21 hasta 23 nucleótidos de longitud y que corresponde a una secuencia del gen que se dirige al ARNm del gen para la degradación en la célula *in vitro* o una célula del organismo *in vitro* y devolver la célula del organismo al organismo;
- (b) mantener la célula o el organismo producido en (a) en condiciones en las que se produce la degradación del ARNm, mediando de este modo en la interferencia por ARN del ARNm del gen en la célula o el organismo, mediante lo cual, en el caso en el que la célula se devuelve al organismo, el procedimiento no es terapéutico ni de diagnóstico.

5. Un procedimiento para examinar la función de un gen en una célula de prueba o un organismo de prueba, que comprende mediar en la interferencia por ARN de ARNm de un gen en una célula o un organismo según se reivindica en la reivindicación 4, en el que el organismo es un organismo no humano y la célula y el organismo son una célula de prueba y un organismo de prueba, respectivamente; y

- (c) observar el fenotipo de la célula de prueba o el organismo de prueba producido en (b) y, opcionalmente, comparar el fenotipo observado con el de una célula control o un organismo control apropiado, proporcionando de este modo información sobre la función del gen.

6. Un procedimiento según la reivindicación 4, que comprende además:

- (a) combinar el ARN bicatenario que corresponde a una secuencia del gen con un extracto soluble que media en la interferencia por ARN, produciendo de este modo una combinación;
- (b) mantener la combinación producida en (a) en condiciones en las que el ARN bicatenario se procesa para dar ARN desde 21 hasta 23 nucleótidos de longitud, produciendo de este modo ARN bicatenario desde 21 hasta 23 nucleótidos de longitud;
- (c) aislar el ARN bicatenario desde 21 hasta 23 nucleótidos de longitud producido en
- (d) antes de la etapa de introducción del ARN aislado en (c) en la célula o el organismo.

7. Un procedimiento para evaluar si un agente actúa sobre un producto génico que comprende mediar en la interferencia por ARN de ARNm de un gen en una célula o un organismo según se reivindica en la reivindicación 4, en el que el organismo es un organismo no humano y:

- (c) introducir el agente en la célula *in vitro* o la célula del organismo *in vitro* de (b) antes de devolver la célula al organismo; y
- (d) determinar si el agente tiene un efecto sobre la célula o el organismo, en el que si el agente no tiene ningún efecto sobre la célula o el organismo, entonces el agente actúa sobre el producto génico o en una ruta biológica que implica al producto génico.

ES 2 336 887 T3

8. Un procedimiento para evaluar si un producto génico es una diana adecuada para el descubrimiento de fármacos que comprende mediar en la interferencia por ARN de ARNm de un gen en una célula o un organismo según se reivindica en la reivindicación 4, en el que el organismo es un organismo no humano y la degradación del ARNm da como resultado una expresión disminuida del gen; y;

(c) determinar el efecto de la expresión disminuida del gen sobre la célula o el organismo, en el que si la expresión disminuida tiene un efecto, entonces el producto génico es una diana para el descubrimiento de fármacos.

9. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en el que el gen codifica un ARNm celular o un ARNm viral.

10. Un procedimiento para producir células con silenciamiento génico, que comprende introducir en células en las que va a silenciarse un gen, ARN bicatenario aislado de desde 21 hasta 23 nucleótidos de longitud y que corresponde a una secuencia del gen, que se dirige al ARNm que corresponde al gen y que mantiene las células resultantes en condiciones en las que se produce la iARN, que da como resultado la degradación del ARNm del gen, produciendo de este modo células con silenciamiento génico.

11. Un procedimiento para identificar sitios diana dentro de ARNm que se rompe eficazmente mediante el proceso de iARN, que comprende combinar ARN bicatenario desde 21 hasta 23 nucleótidos de longitud y que corresponde a una secuencia de un gen que va a degradarse, ARNm marcado que corresponde al gen y un extracto soluble que media en la interferencia por ARN, produciendo de este modo una combinación; mantener la combinación en las condiciones en que el ARN bicatenario se degrada e identificar sitios en el ARNm que se rompen eficazmente.

12. Un procedimiento para identificar ARN de 21-23 nucleótidos que median eficazmente en la iARN, en el que dichos ARN de 21-23 nt abarcan los sitios diana identificados dentro del ARNm mediante la realización del procedimiento según la reivindicación 11, y que comprende además identificar un ARN de 21-23 nucleótidos que abarca los sitios diana.

13. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el ARN bicatenario se obtiene a partir de ARN bicatenario que se ha roto en fragmentos desde 21 hasta 23 nucleótidos de longitud.

14. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el ARN bicatenario comprende un grupo hidroxilo terminal en 3'.

15. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el ARN bicatenario es ARN sintetizado químicamente.

16. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que el ARN comprende uno o más nucleótidos no convencionales, incluyendo nucleótidos no producidos en la naturaleza.

17. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que el ARN bicatenario se aísla utilizando un procedimiento seleccionado de electroforesis en gel, procedimientos no desnaturizantes, o cromatografía en columna no desnaturizante.

18. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que el ARN bicatenario es complementario a uno o más de ARNm celular de mamíferos, ARNm humano o ARNm viral.

19. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, 6, 11 ó 12, en el que el extracto soluble se deriva de blastodermo sincitial de embriones de *Drosophila*.

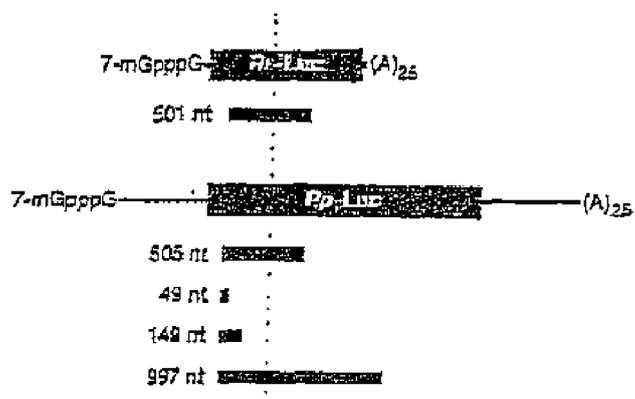


Figura 1

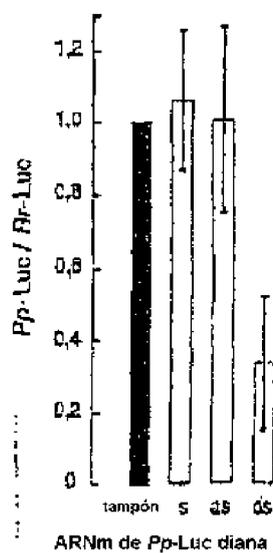


Figura 2A

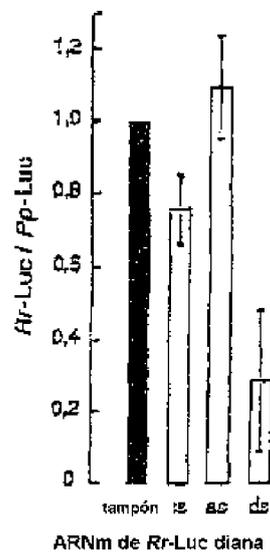


Figura 2B

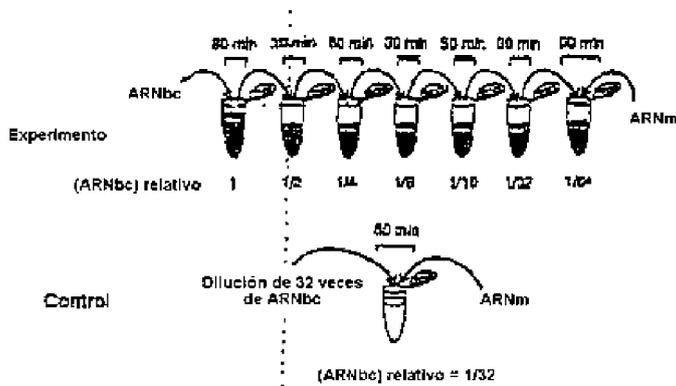


Figura 3A

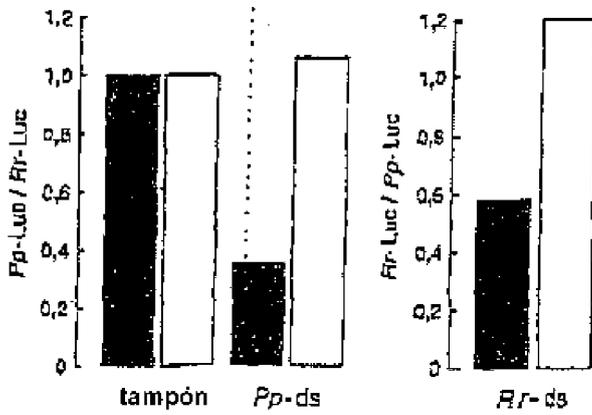


Figura 3B

Figura 3C

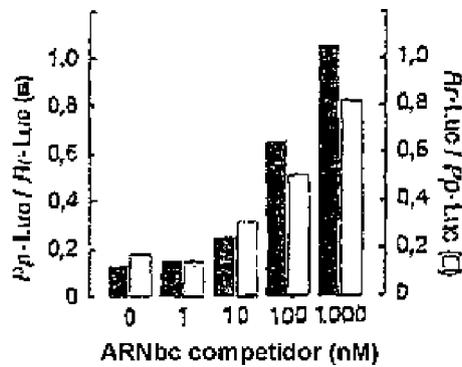


Figura 4

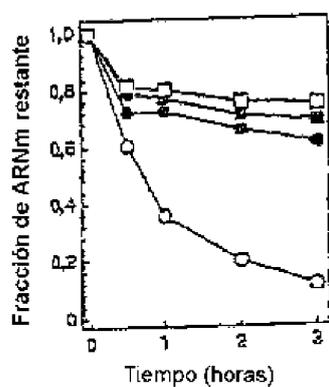


Figura 5A

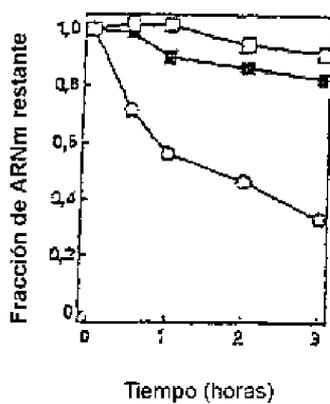


Figura 5B

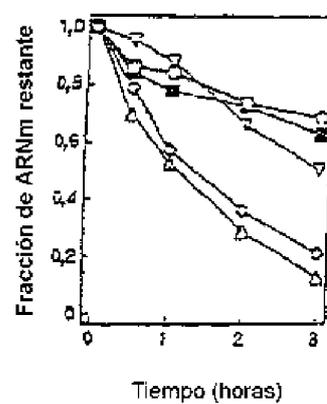


Figura 5C

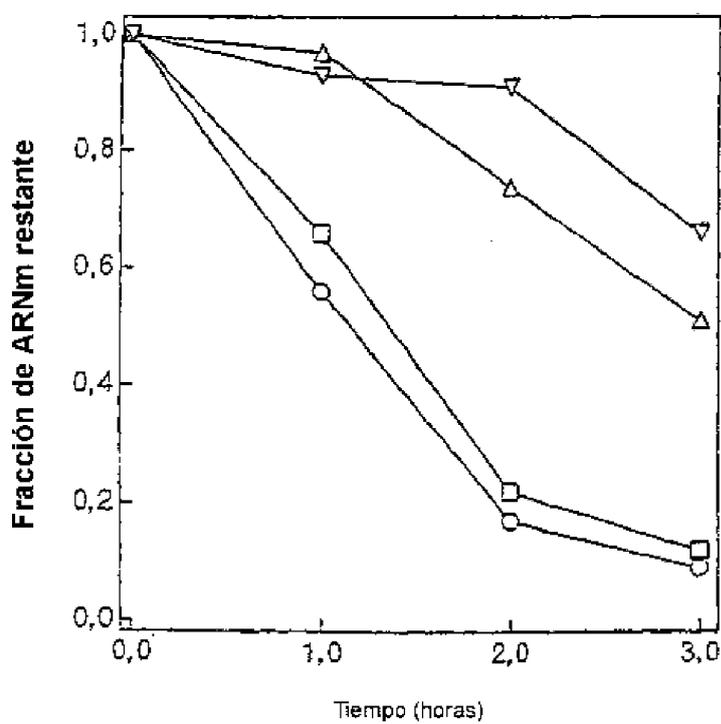


Figura 6

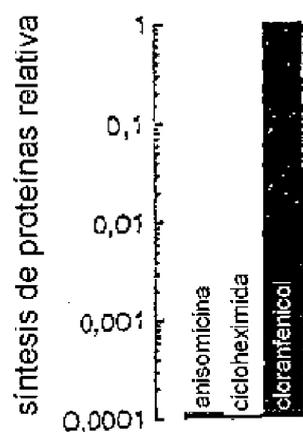


Figura 7A

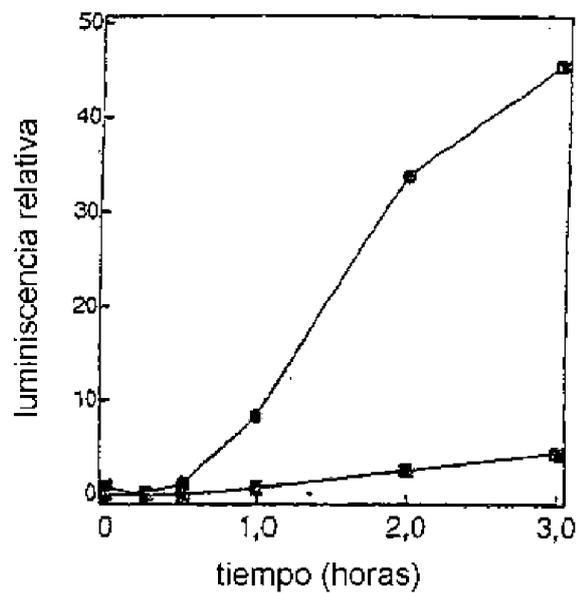


Figura 7B

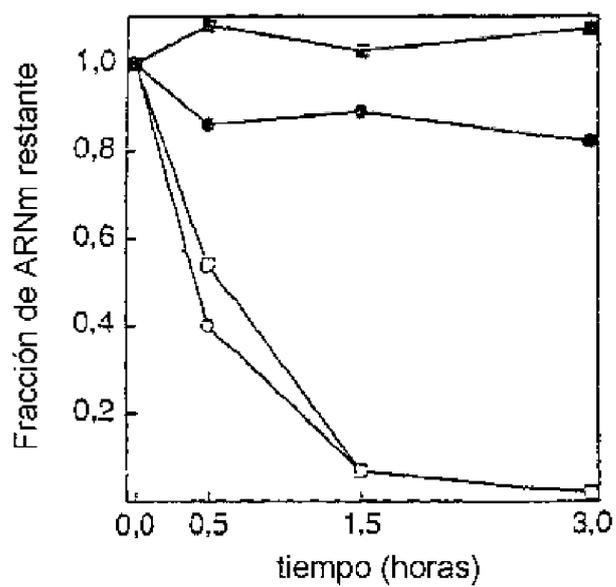


Figura 7C

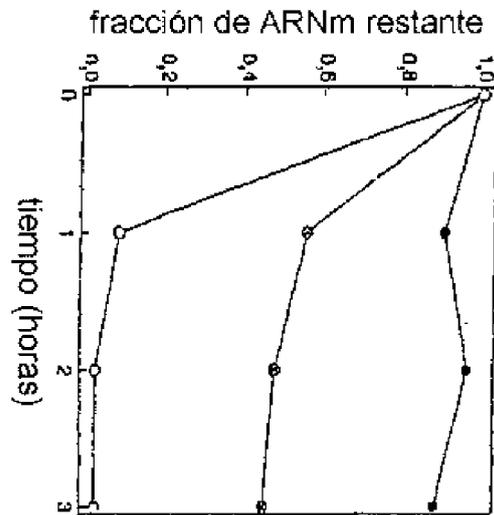


Figura 8A

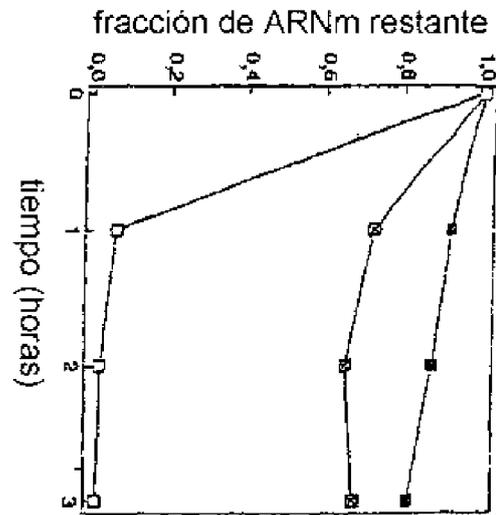


Figura 8B

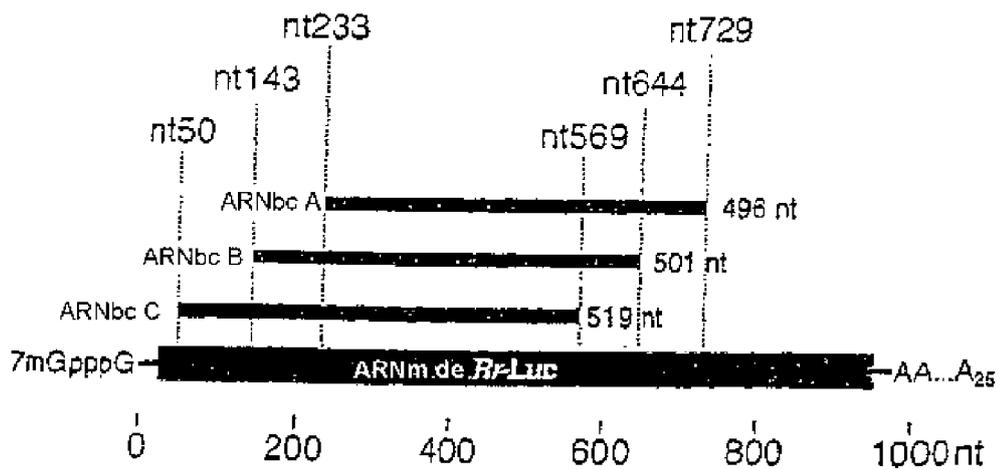
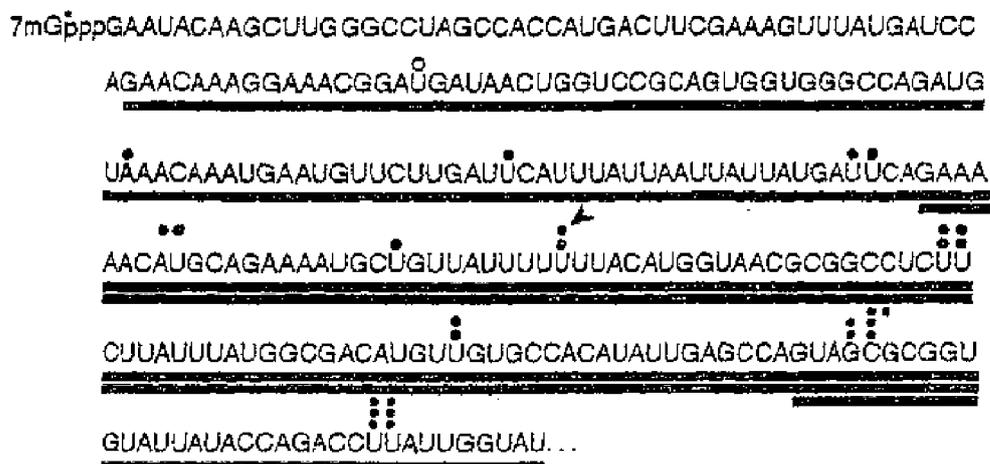


Figura 9

Figura 10



Silenciamiento génico específico de secuencia mediante fragmentos de 21-23 nt

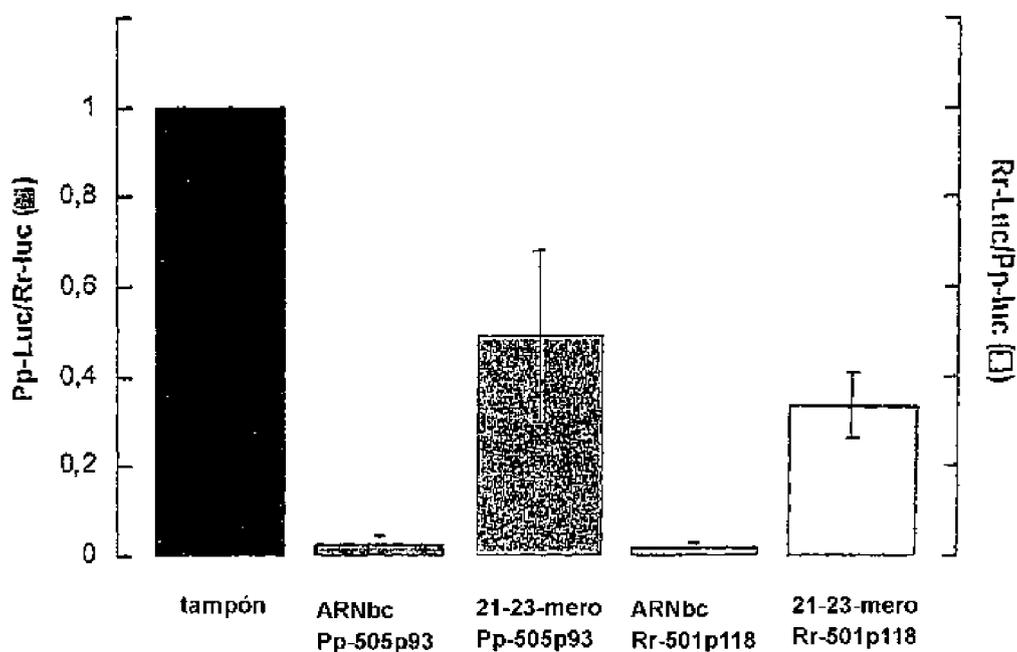


Figura 12

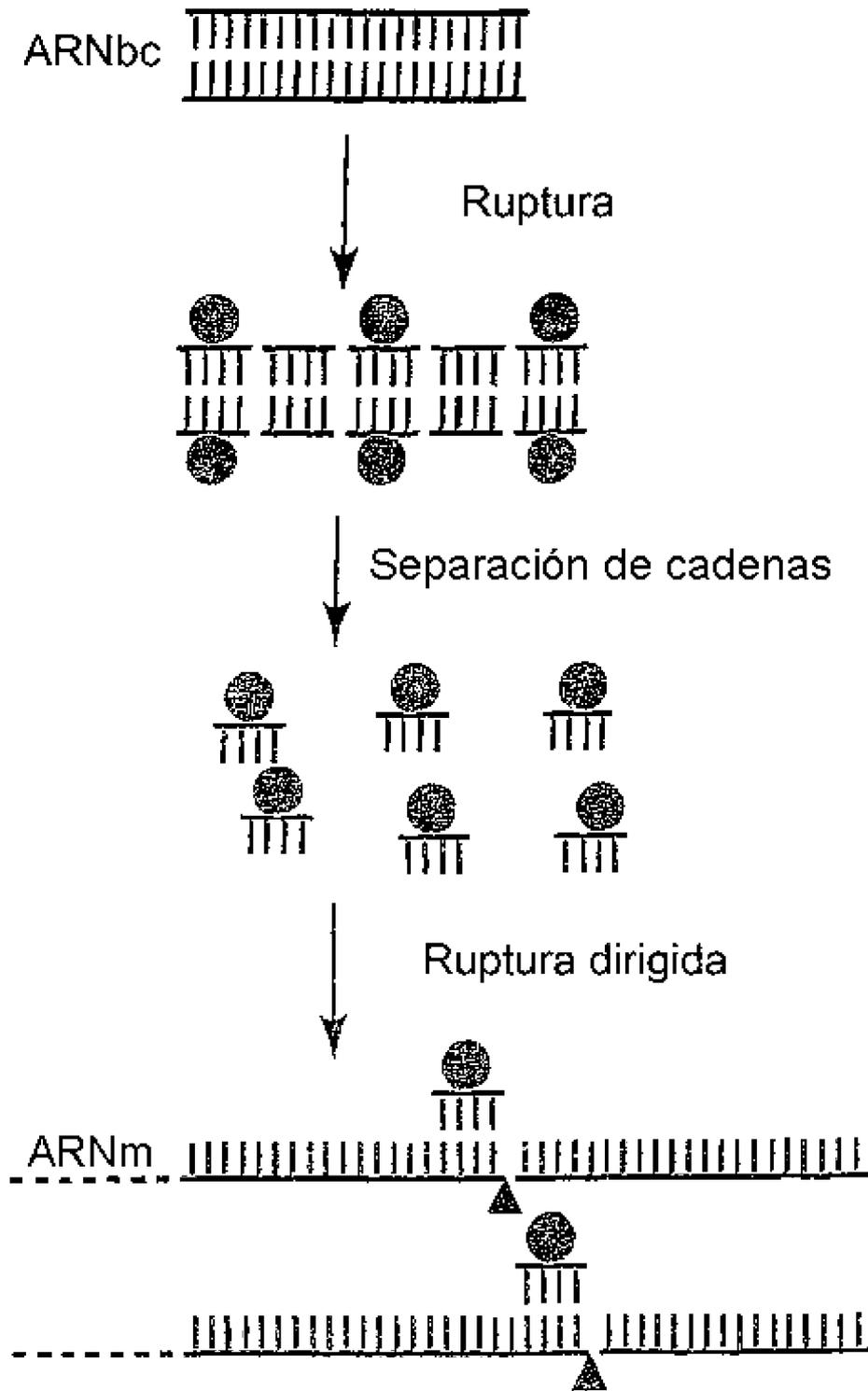


Figura 11

Figura 13A

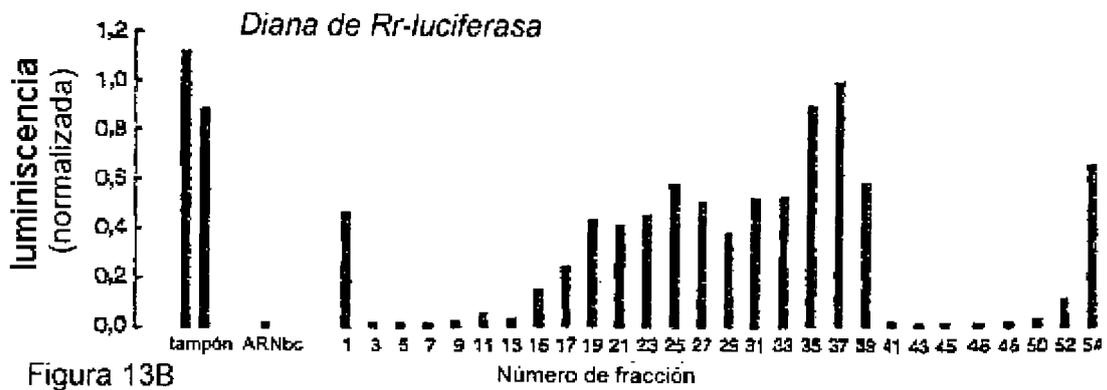
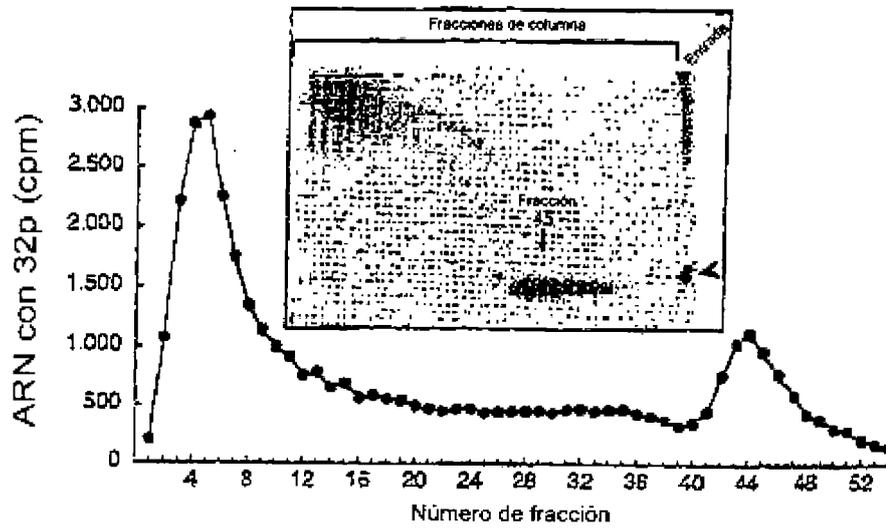


Figura 13B

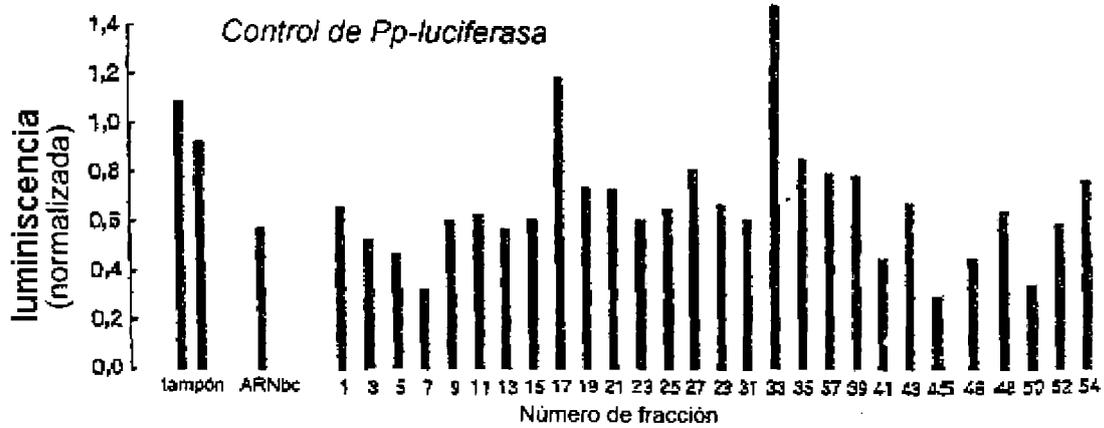


Figura 13C

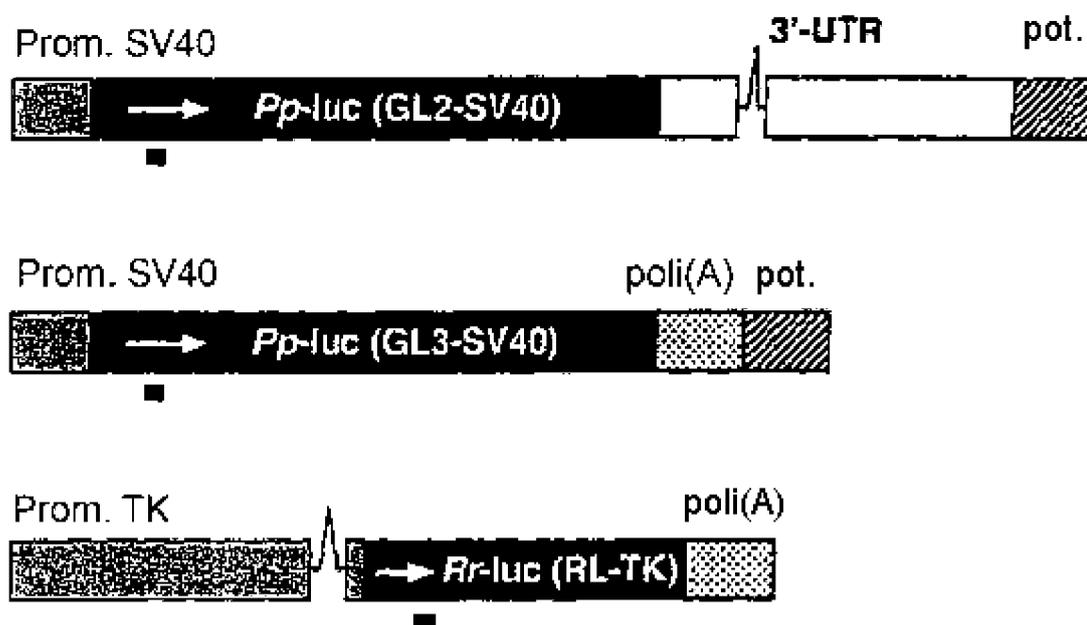


Figura 14A

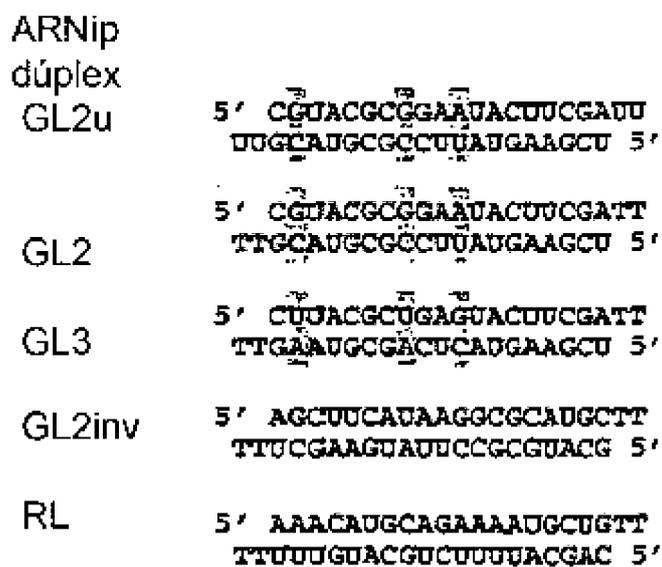


Figura 14B

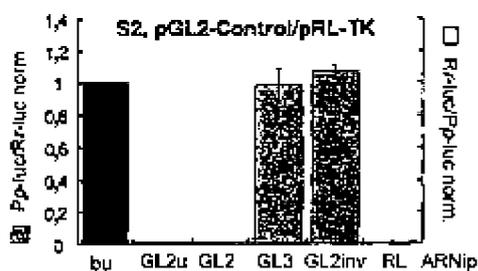


Figura 15A

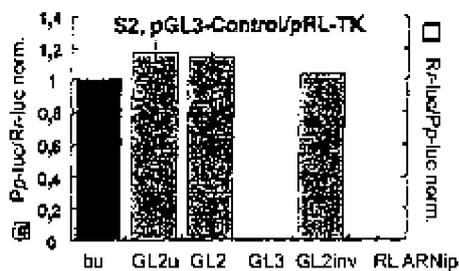


Figura 15B

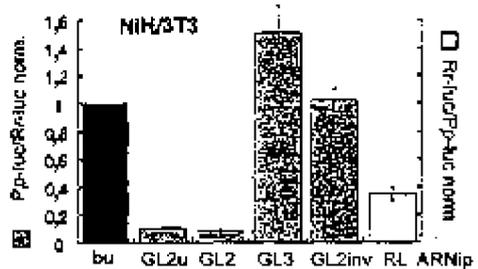


Figura 15C

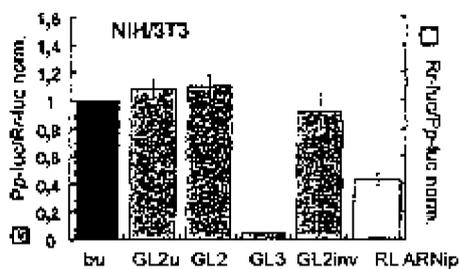


Figura 15D

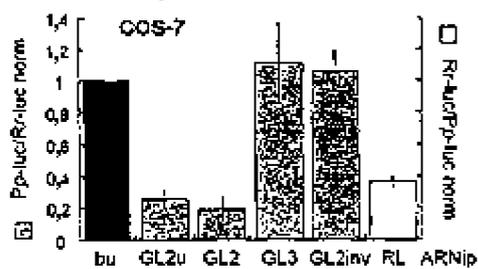


Figura 15E

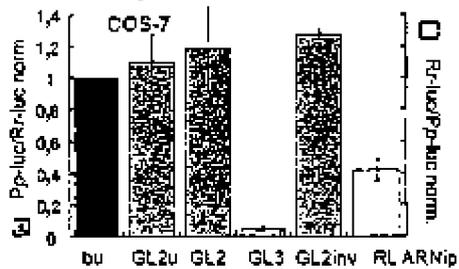


Figura 15F

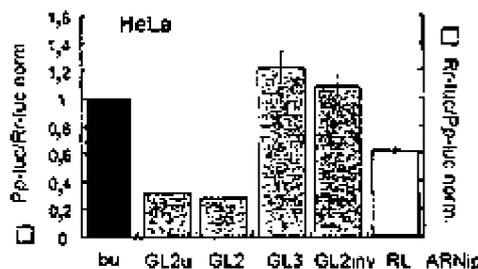


Figura 15G

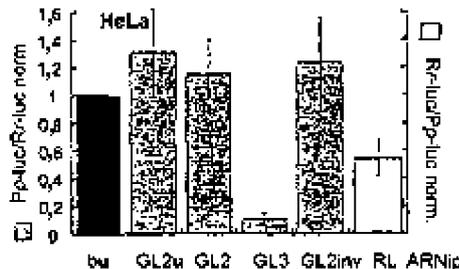


Figura 15H

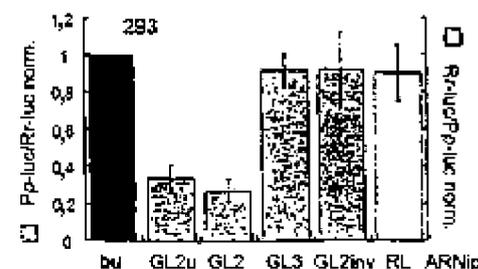


Figura 15I

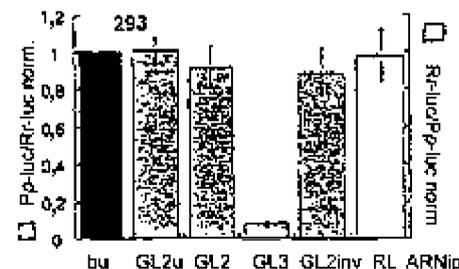


Figura 15J

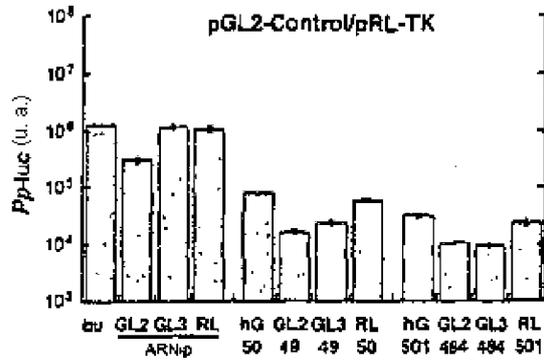


Figura 16A

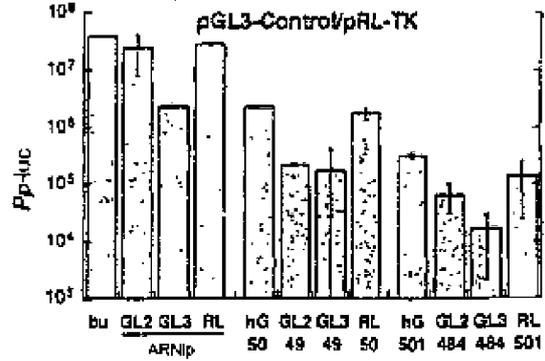


Figura 16B

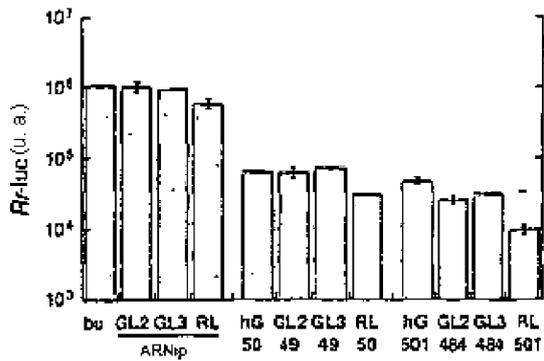


Figura 16C

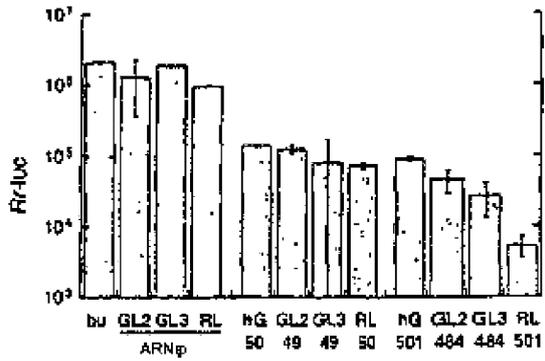


Figura 16D

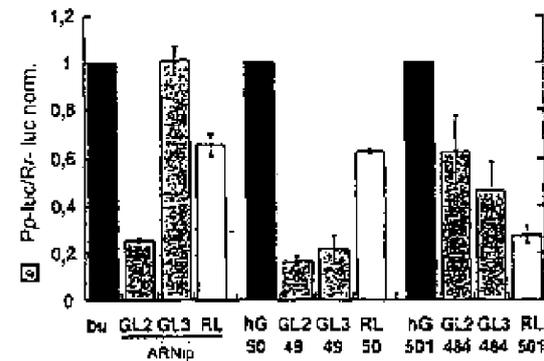


Figura 16E

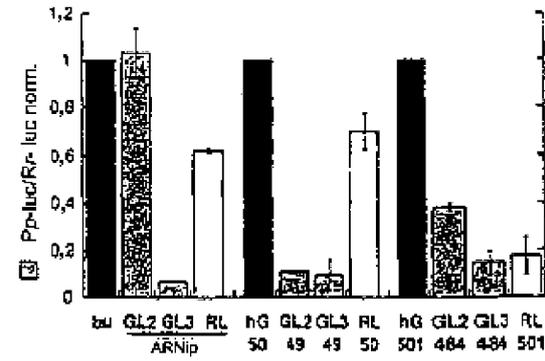


Figura 16F