



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 116**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/88 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04753972 .1**

96 Fecha de presentación : **02.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1633890**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2006**

54

Título: **Métodos y composiciones para mejorar la eficacia y especificidad de FNAI.**

30

Prioridad: **02.06.2003 US 475331 P**
30.09.2003 US 507928 P
28.05.2004 US 575268 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.04.2011

73

Titular/es: **University of Massachusetts**
One Beacon Street, 26th Floor
Boston, Massachusetts 02108, US

72

Inventor/es: **Schwarz, Dianne;**
Zamore, Phillip, D.;
Simard, Martin y
Hutvagner, Gyorgy

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 357 116 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).

DESCRIPCION

Métodos y composiciones para mejorar la eficacia y especificidad de FNAI.

Derechos Gubernamentales

- 5 Esta invención se hace por lo menos en parte con el apoyo del gobierno de los Estados Unidos bajo los nos. de consesión R01 GM62862-01, GM65236-01, y R21 NS44952-01 adjudicado por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno de los Estados Unidos puede tener ciertos derechos en esta invención.

Antecedente de la Invención

- 10 Dos tipos de activadores de ARN ~21 nt de silenciamiento de gen post-transcripcional en animales: ARN de interferencia pequeña (siARN) y microARN (miARN). Los siARN y miARN se producen mediante la división de
 15 precursores de ARN bicatenario (dsARN) por Dicer, una familia RNasa III de endonucleasas específicas por dsARN (Bernstein et al., 2001; Billy et al., 2001; Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001; Knight y Bass, 2001; Paddison et al., 2002; Park et al., 2002; Provost et al., 2002; Reinhart et al., 2002; Zhang et al., 2002; Doi et al., 2003; Myers et al., 2003). Los siARN resultan cuando los transposones, virus o genes endógenos expresan dsARN largo o cuando el dsARN se introduce experimentalmente en células de planta o animal para
 20 activar silenciamiento de gen, un proceso conocido como interferencia de ARN (ARNi) (Fire et al., 1998; Hamilton and Baulcombe, 1999; Zamore et al., 2000; Elbashir et al., 2001 a; Hammond et al., 2001; Sijen et al., 2001; Catalanotto et al., 2002). En contraste, los miARN son los productos de genes endógenos, no codificantes cuyos transcriptos ARN precursores pueden formar bucles de tallo pequeño de los que se dividen miARN maduros por Dicer (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001; Lagos-Quintana et al., 2002; Mourelatos et al., 2002; Reinhart et al., 2002; Ambros et al., 2003; Brennecke et al., 2003; Lagos-Quintana et al., 2003; Lim et al., 2003a; Lim et al., 2003b). Se codifican miARN en genes distintos de los mARN cuya expresión ellos controlan.

- 25 Los siARN primero se identifican como los determinantes de especificidad de la ruta de interferencia de ARN (ARNi) (Hamilton y Baulcombe, 1999; Hammond et al., 2000), en donde ellos actúan como guías para dirigir la división endonucleolítica de sus ARN objetivo (Zamore et al., 2000; Elbashir et al., 2001 a). Los dúplex siARN prototípicos son 21 nt, los ARN bicatenarios que contienen 19 pares base, con dos nucleótidos, extremos suspendidos 3' (Elbashir et al., 2001 a; Nykänen et al., 2001; Tang et al., 2003). Los siARN activos contienen fosfatos 5' e hidroxilos 3' (Zamore et al., 2000; Boutla et al., 2001; Nykänen et al., 2001; Chiu and Rana, 2002). De forma similar, los miARN contienen grupos fosfato 5' e hidroxilo 3', que reflejan su producción por Dicer (Hutvagner et al., 2001; Mallory et al., 2002).

- 30 En las plantas, los miARN regulan la expresión de proteínas importantes desarrolladas, frecuentemente al dirigir la división de mARN (Rhoades et al., 2002; Reinhart et al., 2002; Llave et al., 2002a; Llave et al., 2002b; Xie et al., 2003; Kasschau et al., 2003; Tang et al., 2003; Chen, 2003). Aunque los miARN de planta muestran un alto grado de complementariedad con sus objetivos mARN, miARN de animal solo tienen complementariedad limitada para los
 35 mARN cuya expresión ellos controlan (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993; Olsen and Ambros, 1999; Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000; Abraham et al., 2003; Brennecke et al., 2003; Lin et al., 2003; Xu et al., 2003). Se considera que el miARN de animal reprime la traducción del mARN, que promueve la destrucción de mARN objetivo (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993; Olsen and Ambros, 1999; Brennecke et al., 2003). La evidencia actual sugiere que las dos clases de ARN pequeños son funcionalmente intercambiables, con la elección de la división de
 40 mARN o represión traduccional determinada únicamente por el grado de complementariedad entre el ARN pequeño y su objetivo (Hutvagner and Zamore, 2002; Doench et al., 2003). Adicionalmente, los siARN y los miARN se encuentran en complejos similares, si no idénticos, que sugieren que un único complejo bifuncional – complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) - media la división y el control traduccional (Mourelatos et al., 2002; Hutvagner and Zamore, 2002; Caudy et al., 2002; Martinez et al., 2002). No obstante, los estudios en plantas y animales muestran que en estado de equilibrio, los siARN y los miARN difieren en por lo menos un respecto crucial:
 45 in vivo y e vitro, los siARN son bicatenarios, aunque los miARN son monocatenarios (Lee et al., 1993; Hamilton and Baulcombe, 1999; Pasquinelli et al., 2000; Reinhart et al., 2000; Elbashir et al., 2001a; Djikeng et al., 2001; Nykänen et al., 2001; Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001; Lagos-Quintana et al., 2002; Reinhart et al., 2002; Llave et al., 2002a; Silhavy et al., 2002; Llave et al., 2002b; Tang et al., 2003).

- 50 Los dúplex siARN se pueden ensamblar en RISC en la ausencia de mARN objetivo, in vivo e in vitro (Tuschl et al., 1999; Hammond et al., 2000; Zamore et al., 2000). Cada RISC solo contiene una de las dos hebras del dúplex siARN (Martinez et al., 2002). Debido a que los dúplex siARN no tienen conocimiento anterior de lo cual la hebra siARN guiará la división objetivo, ambas hebras se pueden unir con las proteínas apropiadas para formar un RISC. Previamente, nosotros y otros muestran que ambas hebras siARN son competentes para dirigir ARNi (Tuschl et al., 1999; Hammond et al., 2000; Zamore et al., 2000; Elbashir et al., 2001b; Elbashir et al., 2001a; Nykänen et al.,
 55 2001). Es decir, la hebra anticodificante de un siARN puede dirigir la división de un objetivo ARN codificante

correspondiente, aunque la hebra siARN codificante dirige la división de un objetivo anticodificante. En esta forma, el dúplex siARN parece ser funcionalmente simétrico. La capacidad de controlar que hebra de un dúplex siARN entra en el complejo RISC para dirigir la división de un objetivo ARN correspondiente proporcionaría un avance significativo para la investigación y las aplicaciones terapéuticas de tecnología de ARNi.

5 Resumen de la Invención

Una etapa clave en la interferencia de ARN (ARNi) es el ensamble de un complejo de ARN de proteína catalíticamente activa, el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que media la división de ARN objetivo. La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de las dos hebras de un dúplex siARN que no contribuye igualmente al ensamble de RISC. Las estabilidades absoluta y relativa de los pares bases en el extremo 5' de las dos hebras siARN determina el grado al cual cada hebra participa en la ruta de ARNi. De hecho, el siARN puede ser funcionalmente asimétrico, con sólo una de las dos hebras capaces de activar el ARNi. La presente invención también se basa en el descubrimiento que los miARN monocatenarios se generan inicialmente como dúplex similares a siARN cuyas estructuras predestinan una hebra a ingresar al RISC y la otra hebra a ser destruida. Este hallazgo ayuda a explicar la biogénesis de los miARN monocatenarios; la hebra de miARN de un intermedio similar a dúplex siARN de larga vida se ensambla en un complejo RISC, provocando que se acumulen miARN in vivo como ARN monocatenarios.

La presente invención se basa adicionalmente en el descubrimiento que el RISC puede dividir los objetivos de ARN con hasta cinco emparejamientos incorrectos contiguos en el extremo 5' siARN y ocho emparejamientos incorrectos en el extremo 3' siARN, lo que indica que las bases 5' contribuyen desproporcionalmente a la unión de ARN objetivo, pero no juegan un papel en determinar el índice catalítico, kcat. Este hallazgo explica que las secuencias 5', central y 3' de la hebra guía siARN funcionan para dirigir la división objetivo.

La invención se basa adicionalmente en el descubrimiento que las bases 3' del siARN contribuyen mucho menos que las bases 5' a la longitud general de la unión, pero en su lugar ayuda a establecer la geometría helicoidal requerida para la división objetivo mediada por RISC, consistente con la vista que la catálisis por RISC requiere una hélice central en forma de A (Chiu et al., 2003). Este hallazgo indica que la complementariedad es esencial para represión traduccional mediante siARN diseñados para actuar como miARN de animal, que típicamente represionan la traducción (Doench et al., 2004).

La presente invención se basa adicionalmente en el descubrimiento que cuando un siARN falla en hacer par con los primeros tres, cuatro o cinco nucleótidos del ARN objetivo, el enlace fosfodiéster cortado en el ARN objetivo no se cambia; por coincidir perfectamente el siARN, el RISC mide el sitio de la división del extremo 5' siARN (Elbashir et al., 2001; Elbashir et al., 2001). Este hallazgo indica que la identidad del fosfato que se puede dividir se determina antes del encuentro del RISC con su ARN objetivo, quizás debido a que la endonucleasa RISC se posiciona con respecto al extremo 5' siARN durante el ensamble de RISC

De acuerdo con lo anterior, la actual invención caracteriza métodos para mejorar la eficacia y especificidad de ARNi. También se proporciona un método para reducir el silenciamiento de un objetivo inadvertido mediante un agente ARNi. La invención que caracteriza adicionalmente composiciones, que incluyen siARN, shARN, así como también vectores y transgenes, para mediar ARNi. Los agentes ARNi de la invención han mejorado la especificidad y eficacia en mediar el silenciamiento de un gen objetivo.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

Breve Descripción de los Dibujos

Figura 1. El ARNi mediado por siARN monocatenarios o dúplex asimétricos. (A) El esquema muestra porciones relevantes de las secuencias de ARN objetivo codificante y anticodificante. (B) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes. (C) El esquema muestra las secuencias siARN de hebras únicas individuales y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras sencillas. (D) La gráfica de barras que describe la fracción de siARN total presente como monocatenario. (E) El esquema muestra "la secuencia dúplex de siARN que contiene pares bases tambaleantes G:U y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes.

Figura 2. ARNi mediado por los dúplex de siARN asimétricos. (A) El esquema muestra porciones relevantes de las secuencias de ARN objetivo codificante y anticodificante. (B) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes. (C) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN que contiene emparejamientos incorrectos A:U y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes. (D) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN que contiene emparejamientos incorrectos G:U y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras

codificantes y anticodificantes. (E) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN que contiene un emparejamiento incorrecto C:A y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes.

5 Figura 3. ARNi mediado por los dúplex de siARN asimétricos. (A) El esquema muestra porciones relevantes de las secuencias de ARN objetivo codificante y anticodificante. (B) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes. (C) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN que contiene emparejamientos incorrectos A:G y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes. (D) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN que contiene emparejamientos incorrectos C:U y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes. (E) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN que contiene el par base A:U y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes. (F) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN que contiene emparejamientos incorrectos A:G y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes. (G) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN que contiene emparejamientos incorrectos C:U y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes. (H) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN que contiene el par base A:U y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes. (I) El esquema de monocatenarios individuales de los siARN y la gráfica que describe ARNi mediado por los monocatenarios individuales.

20 Figura 4. ARNi mediado por los dúplex de siARN asimétricos que contienen inosina. (A) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN que tiene inosina en el extremo 5' de la hebra codificante y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes. (B) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN que tiene inosina en el extremo 5' de la hebra anticodificante y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes. (C) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN que contiene inosina en ambas hebras y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes. (D) El esquema muestra hebras siARN individuales que contienen inosina y la gráfica que describe ARNi mediado por los monocatenarios individuales.

Figura 5. La división simétrica de pre-let-7 por Dicer. (A) Análisis de los productos de división producidos en el lado 5' de la corriente precursora (let-7). (B) Análisis de los productos de división producidos en el lado 3' de la corriente precursora (let-7*). (C) Dicer conceptual de pre-let-7 en un siARN pre-let-7 deducido.

30 Figura 6. Análisis de genes miARN Drosophila para el miARN y mARN* predicho. (A) Dicer Conceptual de 26 genes miARN Drosophila pulicados en siARN dúplex deducido. (B) Cantidades de miR-10 y miR-10* detectadas in vivo.

Figura 7. El esquema representa el mecanismo del ensamble de RISC de pre-miARN o dsARN.

35 Figura 8. Reducción de silenciamiento sin objetivo mediante la hebra codificante. (A) Las secuencias de ARN objetivo sod1 codificante y anticodificante. (B) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes. (C) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN que contiene el par base oscilante G:U y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes. (D) El esquema muestra hebras siARN individuales y la gráfica que describe ARNi mediado por los monocatenarios individuales. (E) El análisis termodinámico de los extremos 5' de la hebra siARN para el dúplex siARN en (B). ΔG (kcal/mol) de calcula en 1M NaCl a 37°C.

40 Figura 9. Mejoramiento de silenciamiento mediante la hebra anticodificante. (A) El esquema muestra porciones relevantes de las secuencias de ARN objetivo codificante y anticodificante. (B) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes. (C) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN que contiene el par base A:U y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes. (D) El esquema muestra la secuencia dúplex de siARN que contiene emparejamientos incorrectos A:G y la gráfica que describe ARNi mediado por las hebras codificantes y anticodificantes. (E) El análisis termodinámico de los extremos 5' de la hebra siARN para el dúplex siARN en (B). ΔG (kcal/mol) de calcula en 1M de NaCl a 37°C.

50 Figura 10. La estabilidad termodinámica relativa de los primeros cuatro pares base de las hebras siARN explica la asimetría funcional siARN. El análisis termodinámico de los extremos 5' de la hebra siARN para los siARN en las Figuras 1B y 1E. ΔG (kcal/mol) se calcula en 1M de NaCl a 37°C.

Figura 11. Los primeros cuatro pares base del dúplex siARN determinan la actividad específica de la hebra. Los emparejamientos incorrectos únicos de nucleótido internas (A-F) cerca al extremo 5 de una hebra siARN generan asimetría funcional, pero no los pares G:U oscilantes internos (G-I).

Figura 12. Índice incrementado de eficiencia siARN cuando los dúplex tienen colas con emparejamiento incorrecto dTdT.

Figura 13. La liberación del producto limita el índice de catálisis mediante RISC. (a) El ATP estimula múltiples rondas de división RISC del objetivo de ARN. Se incubó siARN con ATP en el lisato de embrión *Drosophila*, luego el NEM se agrega para apagar el ensamble de RISC y para incapacitar el sistema de regeneración ATP. La energía que regenera el sistema se restaura al agregar quinasa creatina adicional (+ATP) o la reacción es ATP agotado al agregar hexoquinasa y glucosa (-ATP). ARN objetivo. La concentración es 49 nM y la concentración de RISC es -4 nM. La secuencia de siARN se da en la Figura 21. (b) En la ausencia de ATP, la división mediante RISC produce un estado de pre-equilibrio aunque igual, dentro del error, en la concentración de RISC activo. La concentración objetivo es 110 nM y la concentración RISC es -4 nM. (c) La catálisis mediante RISC no se mejora por ATP bajo condiciones simples de recambio. El RISC está presente en exceso de molde -8- sobre el objetivo. Cada punto de datos representa el promedio de dos ensayos.

Figura 14. En la ausencia de ATP, los emparejamientos incorrectos entre el extremo 3' de la hebra guía siARN y el ARN objetivo facilita la liberación del producto, pero reduce el índice de división objetivo. (a) Las secuencias siARN representativas se muestran alineadas con la secuencia objetivo. La hebra guía siARN está en color (5' a 3') y el emparejamiento incorrecto con el sitio objetivo se resalta en amarillo. Una lista completa de las secuencias siARN aparece en la Figura 21. (b) El índice de estado de equilibrio de la división en la presencia y ausencia de ATP se determina para siARNs con cero a cuatro emparejamientos incorrectos 3' con el sitio objetivo. El ARN objetivo la concentración es 49 nM y la concentración de RISC es -4 nM (sin emparejamientos incorrectos) o -6 nM (1 a 4 emparejamientos incorrectos). La velocidad de equilibrio con ATP, con relación a la velocidad sin ATP se muestra para cada siARN. (c) El curso de tiempo de la división para coincidir perfectamente (-16 veces de exceso de RISC con relación al objetivo) y emparejamientos incorrectos (-80 veces de exceso de RISC) siARN. (d) Los datos representativos de aquellos utilizados en el análisis en (c) para la división objetivo dirigida mediante los siARN con cero, cuatro, y cinco emparejamientos incorrectos 3'.

Figura 15. Tolerancia destacada de RISC para emparejamientos incorrectos 3'. (a) cada coincidencia 3' adicional reduce adicionalmente el índice de la división mediante RISC. Los índices de estado de equilibrio de la división se determinan para siARN con cero, una, dos, y cuatro emparejamientos incorrectos bajo múltiples condiciones de recambio (-49 nM mARN objetivo y -4-6 nM de RISC). (b) Los análisis de siARN llevan cero a cinco emparejamientos incorrectos 3' con el ARN objetivo bajo condiciones de exceso ligero de enzima (-2 veces más RISC que el objetivo). Las secuencias siARN utilizadas en (a) y (b) se muestran en la Figura 14A y Figura 21. (c) El análisis de punto final extendido de división RISC bajo condiciones de -80 veces exceso de enzima revela que la división puede ocurrir para los siARN con tanto como ocho emparejamientos incorrectos con el ARN objetivo. Note las escalas de tiempo diferentes en (c) versus (b). Todas las reacciones están bajo las condiciones estándar in vitro ARNi (+ATP).

Figura 16. Tolerancia limitada de RISC para 5' emparejamientos incorrectos. (a) La división de RISC se analiza como en la Figura 21C utilizando siARN 5' no coincidentes, cuyas secuencias se dan en la Figura 21. El ARN objetivo es el mismo para todos los siARN. (b) La división de RISC se analiza utilizando una secuencia siARN única. Se crean emparejamientos incorrectos al alterar la secuencia del ARN objetivo. Para el objetivo que contiene mutaciones compensatorias, la concentración objetivo es 0.25 nM y la concentración de siARN es -20 nM.; La concentración de RISC no se determina. El asterisco denota un segundo punto de tiempo 15. (c) La división de RISC se analiza al incubar 50 nM de siARN con 0.5 nM de ARN objetivo. Se crean emparejamientos incorrectos 3' al modificar la secuencia objetivo, y los emparejamientos incorrectos 5' al cambiar el siARN. El objetivo y las secuencias siARN se dan en la Figura Complementaria 3. (d) La formación de par base perfecta y el emparejamiento incorrecto 5' de los siARN dirigen la división en la misma unión fosfodiéster. Las reacciones de división se desarrollan con -20 nM de RISC generado de 50 nM de siARN y 0.5 nM de ARN objetivo y se analizan en un gel de secuenciación de 8% de poli(acrilamida) desnaturante. El mARN objetivo es 182 nt y el producto de división 5' es 148 nt. Después que se ensambla RISC, el extracto se trata con NEM para inactivar nucleasas (Schwartz et al., 2004). Después del tratamiento de NEM, el sistema de regeneración ATP se almacena al agregar quinasa creatina adicional, luego el ARN objetivo se agrega y la incubación continúa durante el tiempo indicado. El OH denota una escalera de hidrólisis base.

Figura 17. El análisis Michaelis-Menten y K_i para siARN emparejados y con emparejamientos incorrectos revelan distintas contribuciones para la unión y catálisis para las regiones 5', central, y 3' del siARN. (a) el siARN se ensambla en RISC bajo condiciones estándar in vitro ARNi, luego se diluye para alcanzar la concentración de RISC deseada. Las relaciones iniciales de la división se determinan para incrementar las concentraciones de mARN objetivo radiomarcado con 32P-cap 5'. El gráfico de velocidad inicial versus la concentración de sustrato. El K_M y V_{max} se determinan al fijar los datos a la ecuación Michaelis-Menten. Ver Tabla 1 para análisis. Las determinaciones de índice inicial representativas aparecen en la Figura 20A. (b) Los valores K_i se determinan en ensayos de competición utilizando oligonucleótidos 2'-O-metilo que llevan emparejamientos incorrectos 5', central, y 3' en la hebra guía siARN. Los datos representativos se presentan en la Figura 20B, y una lista completa de los oligonucleótidos 2'-O-metilo utilizados aparecen en la Figura 21.

Figura 18. Un modelo para el ciclo del ensamble de RISC, el reconocimiento objetivo, catálisis, y reciclaje.

Figura 19. El RISC programado exógenamente es una enzima auténtica siARN se ensambla en RISC durante 1 hora en una reacción ARNi in vitro ARNi estándar, luego el ensamble se apaga con maleimida N-etilo (NEM)21,29. La cantidad de RISC formada se determina al medir siARN radiomarcado 32P se retiene en un anclaje 5'-biotinilado, 31-nt, oligonucleótido 2'-O-metilo complementario a la hebra guía del siARN. El RISC se une esencialmente irreversiblemente en un anclaje los oligonucleótidos 2'-O-metilo, pero no pueden dividir estos análisis de ARN (Hutvågner et al., 2004; Schwartz et al., 2003). En todos los experimentos, la actividad de división objetivo no se detecta en el sobrenadante, demostrando que se retiene todo el RISC activo en los glóbulos. (a) La secuencia del del siARN utilizado (cepa guía en rojo, marcado con 32P-radiomarcado con un asterisco). No se expresa *Drosophila let-7* en embriones de 0-2 horas (Hutvågner et al., 2001), ya que solo la fuente de *let-7* en las reacciones in vitro es el siARN *let-7* exógeno. El extremo 5' de la hebra guía del siARN *let-7* se predice que es termodinámicamente más estable que el extremo 5' de la hebra pasajera, que explica porqué solo se forman bajas concentraciones del RISC programado *let-7* (Schwartz et al., 2003, Khvorova et al., 2003). La cantidad máxima del ensamble RISC varía ampliamente con la secuencia siARN. Los siARN utilizados en las Figuras 3-8 se diseñan para carga =5-veces más hebra guía-que contiene RISC (Hutvågner et al., 2001; Schwartz et al., 2003) (b) El gel representativo confirma que el RISC se remueve por el anclaje de oligonucleótido 2'-O-metilo. Una reacción antes de incubación con el anclaje de oligonucleótido 2'-O-metilo (pre) cuando se compara con el sobrenadante de una reacción se incubaba con los glóbulos solos (simulados), y el sobrenadante de una reacción se incubaba con anclaje de oligonucleótido 2'-O-metilo complementario (post). La reacción amortiguadora no contiene siARN. (c) El análisis de la cantidad de ensamble RISC en varias concentraciones siARN. Se incubaba siARN 32P-radiomarcado 5' con el lisado durante 1 hora, luego las reacciones se apagan mediante tratamiento con NEM, y la concentración de RISC se mide utilizando el método de anclaje de oligonucleótido 2'-O-metilo.

Figura 20. El análisis Michaelis-Menton y Competidor de RISC (a) Los datos representativos para la determinación de las velocidades iniciales para el siARN perfectamente coincidente. Negro, 1 nM objetivo; rojo, 5 nM; azul, 20 nM; y verde, 60 nM. (b) Tres experimentos independientes para inhibición mediante un competidor de oligonucleótido 2'-O-metilo completamente complementario. Se incuban -1 nM RISC y 5 nM de mRNA objetivo radiomarcado 32P-cap con concentración incrementada del competidor, y se calculan las velocidades iniciales y se grafican versus la concentración de competidor.

Figura 21. siARN, sitios objetivo, y oligonucleótidos 2'-O-metilo utilizados en este estudio del análisis Cinético de la Tabla 1 de RISC.

Descripción Detallada de la Invención

Una etapa clave en la interferencia de ARN (ARNi) es el ensamble de un complejo de ARN de proteína catalíticamente activa, el complejo silenciamiento inducido por ARN (RISC), media la división del ARN objetivo. Cada RISC contiene una de las dos hebras del dúplex ARN de interferencia pequeña (siARN) que activa ARNi. La actual invención se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento que las dos hebras de siARN no contribuyen igualmente al ensamble de RISC. Se encuentra que los cambios pequeños en la secuencia de siARN tienen efectos predecibles y profundos en el grado en el cual las dos hebras de un dúplex siARN entran a la ruta ARNi, un fenómeno llamado "asimetría" siARN funcional. Los descubrimientos descritos aquí revelan que la longitud de las interacciones de par base hechas por el extremo 5' de cada hebra siARN con la región 3' de la hebra a la cual este se forma en par determina que las dos hebras participan en la ruta de ARNi. El ensamble de RISC parece estar gobernado por una enzima que inicia el desenvolvimiento de un dúplex siARN en la hebra siARN cuyo extremo 5' es menos fuertemente pareado en la hebra siARN complementaria.

Remarcablemente, tales dúplex de siARN altamente asimétricos reensamblan los intermedios propuestos en la ruta de biogénesis de microARM (miARNs) (Hutvågner y Zamore, 2002; Reinhart et al., 2002; Lim et al., 2003b). Los miARN son endógenos, ARN -21-nt monocatenarios procesados por Dicer de precursores de ARN de bucle -tallos que regulan la expresión del gen en animales y plantas. Una característica notable de los precursores de miARN es su carencia de complementariedad completa en la región de tallo. Los descubrimientos presentados aquí indican un papel importante para las discontinuidades en la región de tallo de miARN; esto es como los miARNs que se generan inicialmente de sus ARN precursores como los dúplex similares a siARN, y que la estructura de estos dúplex predestina que la hebra de miARN ingrese al RISC y la otra hebra se destruye. Así, la naturaleza parece haber optimizado la porción de tallo de los miARN para seguir un conjunto de reglas que dictan que la hebra ingresa al complejo RISC.

Los descubrimientos hechos por los actuales inventores proporcionan reglas a las que los siARN y los shARN se pueden diseñar por ser completamente asimétricos, con solo una de las dos hebras siARN competentes para ingresar al complejo RISC. Al aplicar estas reglas a la selección y diseño de un agente ARNi objetivo, por ejemplo, los siARN y los shARN, la hebra anticodificante del agente ARNi se puede dirigir predeciblemente para ingresar al complejo RISC y media la división del ARN objetivo. De forma similar, la hebra codificante se puede alentar para que

ingrese al complejo RISC, reduciendo o eliminando por lo tanto el silenciamiento objetivo inadvertido por la hebra codificante.

5 De acuerdo con lo anterior, la actual invención proporciona métodos para mejorar la eficiencia (o especificidad) de una reacción de ARNi que comprende identificar una actividad ARNi objetivo que mediado por la hebra codificante de un agente ARNi, y modificar el agente ARNi de tal manera que la resistencia de par base entre el extremo 5' de la hebra anticodificante y el extremo 3' de la hebra codificante es menor con relación a la resistencia de par base del extremo 5' de la hebra codificante y el extremo 3' de la hebra anticodificante (por ejemplo, con relación al agente ARNi premodificado), de tal manera que la hebra codificante es menos efectiva en el ingreso a RISC (por ejemplo, menos efectiva que el agente ARNi premodificado).

10 La actual invención también proporciona métodos para mejorar la eficiencia (o especificidad) de una reacción de ARNi que comprende modificar (por ejemplo, incrementar) la asimetría del agente ARNi de tal manera que la capacidad de la hebra codificante por mediar el ARNi (por ejemplo, mediar la división del ARN objetivo) es menor. En realizaciones preferidas, se incrementa la asimetría en favor del extremo 5' de la hebra anticodificante, por ejemplo, disminuir la longitud de unión (por ejemplo, la longitud de la interacción) entre el extremo 5' de la hebra anticodificante y el extremo 3' de la hebra codificante con relación a la longitud de unión (por ejemplo, la longitud de la interacción) entre el extremo 5' de la hebra codificante y el extremo 3' de la hebra anticodificante. En otras realizaciones, la asimetría se incrementa en favor del extremo 5' de la hebra anticodificante al incrementar la longitud de unión (por ejemplo, la longitud de la interacción) entre el extremo 5' de la hebra codificante y el extremo 3' de la hebra anticodificante, con relación a la longitud de unión (por ejemplo, la longitud de la interacción) entre el extremo 5' de la hebra anticodificante y el extremo 3' de la hebra codificante. En las realizaciones de la invención, la longitud de unión se incrementa, por ejemplo, la unión H se incrementa entre nucleótidos o análogos en el extremo 5', por ejemplo, dentro de 5 nucleótidos de la hebra codificante (numerados del extremo 5' de la hebra codificante) y nucleótidos complementarios de la hebra anticodificante. Se entiende que la asimetría puede ser cero (es decir, sin asimetría), por ejemplo, cuando los enlaces o pares base entre las bases de terminal 5' y 3' que son de la misma naturaleza, longitud o estructura. Más rutinariamente, sin embargo, existe alguna asimetría debido a la naturaleza diferente, longitud o estructura de por lo menos un nucleótido (frecuentemente uno o más nucleótidos) entre los nucleótidos terminales o análogos de nucleótido.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la actual invención proporciona un método para mejorar la capacidad de una hebra anticodificante de un agente ARNi para actuar como un hebra guía en mediar ARNi, que comprende disminuir la resistencia de par base entre el extremo 5' de la hebra anticodificante y el extremo 3' de la hebra codificante del dúplex cuando se compara con la resistencia de par base entre el extremo 3' de la hebra anticodificante y el extremo 5' de la hebra codificante, en donde el extremo 5' de las hebras codificantes y anticodificantes es los cinco nucleótidos en el terminal 5' de las hebras respectivas, y el extremo 3' de las hebras codificantes y anticodificantes es la región de cinco nucleótidos en el terminal 3' de las hebras respectivas que es complementario con el extremo 5' de las hebras complementarias respectivas.

En donde el agente ARNi es un dúplex siARN, el dúplex siARN comprende una hebra codificante y una hebra anticodificante, la eficacia del dúplex siARN se puede mejorar al disminuir la resistencia de par base entre el extremo 5' de la hebra anticodificante (AS 5') y el extremo 3' de la hebra codificante (S 3') cuando se compara con la resistencia de par base entre el extremo 3' de la hebra anticodificante (AS 3') y el extremo 5' de la hebra codificante (S 5'), de tal manera que la eficacia se mejora.

Como se describe aquí, la entrada de una hebra deseada de un dúplex siARN en un complejo RISC se puede promover al mejorar la asimetría del dúplex siARN, de tal manera que se promueve la entrada de la hebra deseada. La asimetría se puede mejorar al disminuir la resistencia de par base entre el extremo 5' de la hebra deseada y el extremo 3' de una hebra complementaria del dúplex cuando se compara con la resistencia de par base entre el extremo 3' de la hebra deseada y el extremo 5' de la hebra complementaria.

En una realización de estos aspectos de la invención, la resistencia de par base es menor debido a pocos pares base G:C entre el extremo 5' de la primera o la hebra anticodificante y el extremo 3' de la segunda o la hebra codificante que entre el extremo 3' de la primera o la hebra anticodificante y el extremo 5' de la segunda o la hebra codificante.

50 En otra realización, la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base de emparejamiento incorrecto entre el extremo 5' de la primera o la hebra anticodificante y el extremo 3' de la segunda o la hebra codificante. Preferiblemente, el par base de emparejamiento incorrecto se selecciona del grupo que consiste de G:A, C:A, C:U, G:G, A:A, C:C y U:U.

55 En una realización, la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base oscilante, por ejemplo, G:U, entre el extremo 5' de la primera o la hebra anticodificante y el extremo 3' de la segunda o la hebra codificante.

En otra realización, la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base que comprende un nucleótido raro, por ejemplo inosina (I). Preferiblemente, el par base se selecciona del grupo que consiste de un I:A, I:U y I:C.

5 En todavía otra realización, la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base que comprende un nucleótido modificado. En realizaciones preferidas, el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste de 2-amino-G, 2-amino-A, 2,6-diamino-G, y 2,6-diamino-A.

10 La actual invención también proporciona un dúplex siARN que comprende una hebra codificante y una hebra anticodificante, en donde la resistencia de par base entre el extremo 5' de la hebra anticodificante (AS 5') y el extremo 3' de la hebra codificante (S 3') es menor que la resistencia de par base entre el extremo 3' de la hebra anticodificante (AS 3') y el extremo 5' de la hebra codificante (S 5'), de tal manera que la hebra anticodificante guía preferiblemente la división de un mRNA objetivo, en donde la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base de emparejamiento incorrecto entre el AS 5' y el S 3', o la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base oscilante entre el AS 5' y el S 3', o la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base que comprende un nucleótido modificado, y en donde el extremo 5' de las hebras codificantes y anticodificantes es los cinco nucleótidos en el terminal 5' de las hebras respectivas, y el extremo 3' de las hebras codificantes y anticodificantes es la región de cinco nucleótidos en el terminal 3' de las hebras respectivas que es complementario con el extremo 5' de las hebras complementarias respectivas.

20 En varias realizaciones de estos aspectos de la invención, el agente ARNi es un dúplex siARN o se deriva de un precursor construido por ingeniería, y se puede sintetizar químicamente o sintetizar enzimáticamente.

En otro aspecto de la actual invención, se proporcionan composiciones que comprenden un dúplex siARN de la invención formulada para facilitar la entrada de el dúplex siARN en una célula. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un dúplex siARN de la invención.

25 Se proporciona adicionalmente un pre-miARN construido por ingeniería que comprende el dúplex siARN de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, así como también un vector que codifica el pre-miARN. En aspectos relacionados, la invención proporciona un pri-miARN que comprende el pre-miARN, así como también un vector que codifica el pri-miARN.

30 También se caracterizan en la actual invención ARN de horquilla pequeña (shARN) que comprende la secuencia de nucleótido idéntica a la hebra codificante y anticodificante del dúplex siARN. En una realización, las secuencias de nucleótido idénticas a la hebra codificante están en la dirección 5' de las secuencias de nucleótido idénticas a la hebra anticodificante. En otra realización, las secuencias de nucleótido idénticas a la hebra anticodificante están en la dirección 5' de las secuencias de nucleótido idénticas a la hebra codificante. Se proporcionan adicionalmente vectores y transgenes que codifican los shARN de la invención.

35 En todavía otro aspecto, la invención proporciona células que comprenden los vectores caracterizados en la actual invención. Preferiblemente, la célula es una célula de mamífero, por ejemplo, una célula humana.

En otros aspectos de la invención, el ARNi o dúplex siARN se puede utilizar en métodos para mejorar silenciamiento de un mRNA objetivo, que comprende poner en contacto una célula que tiene una ruta de ARNi con el agente ARNi o siARN bajo condiciones de tal manera que silenciamiento se mejora.

40 El agente ARNi o dúplex siARN se puede utilizar en métodos para mejorar silenciamiento de un mRNA objetivo en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende el agente ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes de tal manera que el silenciamiento se mejora.

45 Se proporciona adicionalmente un método para reducir el silenciamiento de un mRNA objetivo inadvertido mediante un agente dsARNi, el agente dsARNi comprende una hebra codificante y una hebra anticodificante que involucra las etapas de: (a) detectar un grado significativo de complementariedad entre la hebra codificante y el objetivo inadvertido; y (b) mejorar la resistencia de par base entre el extremo 5' de la hebra codificante y el extremo 3' de la hebra anticodificante con relación a la resistencia de par base entre el extremo 3' de la hebra codificante y el extremo 5' de la hebra anticodificante; de tal manera que el silenciamiento del mRNA objetivo inadvertido se reduce; en donde el extremo 5' de las hebras codificantes y anticodificantes es los cinco nucleótidos en el terminal 5' de las hebras respectivas, y el extremo 3' de las hebras codificantes y anticodificantes es la región de cinco nucleótidos en el terminal 3' de las hebras respectivas que es complementario con el extremo 5' de las hebras complementarias respectivas. En una realización preferida, el silenciamiento del mRNA objetivo inadvertido se reduce con relación al silenciamiento de un mRNA objetivo deseado.

Con el fin de que la invención se pueda entender más fácilmente, primero se definen ciertos términos.

El término "nucleosida" se refiere a una molécula que tiene una base purina o pirimidina ligada covalentemente a una ribosa o azúcar desoxiribosa. Las nucleosidas de ejemplo incluyen adenosina, guanosina, citidina, uridina y timidina. El término "nucleótido" se refiere a una nucleosida que tiene uno o más grupos fosfato unidos en los ligados de éster al grupo funcional de azúcar. Los nucleótidos de ejemplo incluyen monofosfatos, difosfatos y trifosfatos de nucleosida. Los términos "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico" se utilizan intercambiamente aquí y se refieren a un polímero de nucleótidos unidos mediante un ligado fosfodiéster entre 5' y 3' átomos de carbono.

El término "ARN" o "molécula de ARN" o "molécula de ácido ribonucleico" se refiere a un polímero de ribonucleótidos. El término "ADN" o "molécula de ADN" o molécula de ácido desoxiribonucleico" se refiere a un polímero de desoxiribonucleótidos. El ADN y el ARN se pueden sintetizar naturalmente (por ejemplo, mediante replicación de ADN o transcripción de ADN, respectivamente). El ARN se puede modificar postranscripcionalmente. El ADN y el ARN también se pueden sintetizar químicamente. El ADN y el ARN pueden ser monocatenarios (es decir, ssARN y ssADN, respectivamente) o multicatenario (por ejemplo, bicatenario, es decir, dsARN y dsADN, respectivamente). "mARN" o "ARN mensajero" es ARN monocatenario que especifica la secuencia de aminoácido para una o más cadenas de polipéptido. Esta información se traslada durante la síntesis de proteína cuando los ribosomas se unen a mARN.

Como se utiliza aquí, el término "ARN de interferencia pequeña" ("siARN") (también se refiere en la técnica como "ARN de interferencia corta") se refiere a un ARN (o análogo de ARN) que comprende entre aproximadamente 10-50 nucleótidos (o análogos de nucleótido) que es capaz de dirigir o mediar la interferencia de ARN. Preferiblemente, un siARN comprende entre aproximadamente 15-30 nucleótidos o análogos de nucleótido, más preferiblemente entre aproximadamente 16-25 nucleótidos (o análogos de nucleótido), aún más preferiblemente entre aproximadamente 18-23 nucleótidos (o análogos de nucleótido), y aún más preferiblemente entre aproximadamente 19-22 nucleótidos (o análogos de nucleótido) (por ejemplo, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos o análogos de nucleótido).

Como se utiliza aquí, el término "nucleótido raro" se refiere a un nucleótido de ocurrencia natural que ocurre infrecuentemente, incluyendo desoxiribonucleótidos de ocurrencia natural o ribonucleótidos que ocurren infrecuentemente, por ejemplo, un ribonucleótido de ocurrencia natural que no es guanosina, adenosina, citosina, o uridina. Ejemplos de nucleótidos raros incluyen, pero no se limitan a, inosina, 1-metil inosina, pseudouridina, 5,6-dihidrouridina, ribotimidina, 2N-metilguanosina y 2,2N, N-dimetilguanosina.

El término "análogo de nucleótido" o "nucleótido alterado" o "nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido no estándar, que incluyen ribonucleótidos o desoxiribonucleótidos de ocurrencia no natural. Los análogos de nucleótido preferidos se modifican en cualquier posición con el fin de alterar ciertas propiedades químicas del nucleótido para retener todavía la capacidad del análogo de nucleótido de desarrollar su función destinada. Ejemplos de los nucleótidos modificados preferidos incluyen, pero no se limitan a, 2-aminoguanosina, 2-amino-adenosina, 2,6-diamino-guanosina y 2,6-diamino-adenosina. Ejemplos de las posiciones del nucleótido que se pueden derivar incluyen la posición 5, por ejemplo, 5-(2-amino)propil uridina, 5-bromo uridina, 5-propino uridina, 5-propenil uridina, etc.; la posición 6, por ejemplo, 6-(2-amino)propil uridina; la posición 8 para adenosina y/o guanosinas, por ejemplo, 8-bromo guanosina, 8-cloro guanosina, 8-fluoroguanosina, etc. Los análogos de nucleótido también incluyen deaza nucleótidos, por ejemplo, 7-deaza-adenosina; O- y N-modificado (por ejemplo, alquilado, por ejemplo, nucleótidos N6-metil adenosina, o como otra forma conocida en la técnica); y otros alilo heterocíclicos modificados de análogos de nucleótido tal como aquellos descritos en Herdewijn, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 2000 Aug. 10(4):297-310.

Los análogos de nucleótido también pueden comprender modificaciones a la porción de azúcar de los nucleótidos. Por ejemplo el grupo 2' OH se puede reemplazar por un grupo seleccionado de H, OR, R, F, Cl, Br, I, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, COOR, o OR, en donde R es alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, alqueno, alquino, arilo, etc. Otras modificaciones posibles incluyen aquellas descritas en la Patente Estadounidense Nos. 5,858,988, y 6,291,438.

El grupo fosfato del nucleótido también se puede modificar, por ejemplo, al sustituir uno o más de los oxígenos del grupo fosfato con azufre (por ejemplo, fosforotioatos), o al hacer otras sustituciones que permite desarrollar al nucleótido su función destinada tal como se describe en, por ejemplo, Eckstein, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000 Apr. 10(2):117-21, Rusckowski et al. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000 Oct. 10(5):333-45, Stein, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2001 Oct. 11 (5): 317-25, Vorobjev et al. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2001 Apr. 11 (2):77-85, y la Patente Estadounidense No. 5,684,143. Ciertas modificaciones referenciadas anteriormente (por ejemplo, modificaciones del grupo fosfato) preferiblemente reducen el índice de hidrólisis de, por ejemplo, los polinucleótidos que comprenden dichos análogos in vivo o in vitro.

El término "oligonucleótido" se refiere a un polímero corto de nucleótidos y/o análogos de nucleótido. El término "análogo de ARN" se refiere a un polinucleótido (por ejemplo, un polinucleótido químicamente sintetizado) que tiene por lo menos un nucleótido alterado o nucleótido modificado cuando se compara con un ARN no modificado o no alterado correspondiente pero que retiene la misma naturaleza o naturaleza o función como el ARN no modificado o no alterado correspondiente. Como se discutió anteriormente, los oligonucleótidos se pueden ligar con ligados que resultan en un índice inferior de hidrólisis del análogo de ARN cuando se compara con una molécula de ARN con fosfodiligados de éster. Por ejemplo, los nucleótidos del análogo pueden comprender metilenodiol, etileno diol,

oximetilto, oxietilto, oxicarbonilo, fosforodiamidato, fosforoamidato, y/o ligados fosforotioato. Los análogos de ARN preferidos incluyen azúcar- y/o ribonucleótidos que modifican la estructura y/o desoxiribonucleótidos. Tales alteraciones o modificaciones pueden incluir adicionalmente la adición del material sin nucleótido, tal como a los extremos del ARN o internamente (en uno o más nucleótidos del ARN). Un análogo de ARN solo necesita ser
5 suficientemente similar al ARN natural que tiene la capacidad de mediar (media) la interferencia del ARN.

Como se utiliza aquí, el término "interferencia de ARN" ("ARNi") (también se refiere en la técnica como "silenciamiento de gen" y/o "silenciamiento objetivo", por ejemplo, "silenciamiento de mRNA objetivo") se refiere a una degradación intracelular selectiva de ARN. El ARNi ocurre en las células naturalmente para remover los ARN extraños (por ejemplo, ARN víricos). El ARNi natural procede por medio de fragmentos divididos del dsARN libre que
10 dirigen el mecanismo degradativo en otras secuencias de ARN similares. Alternativamente, se puede iniciar el ARNi por la mano del hombre, por ejemplo, silenciar la expresión de los genes objetivo.

Como se utiliza aquí, el término "la hebra anticodificante" de un siARN o agente de ARNi se refiere a una hebra que es sustancialmente complementaria a una sección de aproximadamente 10-50 nucleótidos, por ejemplo, aproximadamente 15-30, 16-25, 18-23 o 19-22 nucleótidos del mRNA del gen objetivo para silenciamiento. La hebra anticodificante o la primer hebra tiene la secuencia suficiente complementaria a la secuencia mRNA para dirigir la interferencia de ARN específica objetivo (ARNi), por ejemplo, la complementariedad suficiente para activar la destrucción del mRNA objetivo deseado mediante la mecanismo o proceso de ARNi. El término "cepa codificante" o "segunda hebra" de un siARN o agente ARNi se refiere a una hebra que es complementaria con la hebra anticodificante o la primera hebra. Las hebras codificante o anticodificante también se refieren como las primeras o
15 segundas hebras, las primeras o segundas hebras que tiene la complementariedad a la secuencia objetivo y la segunda o la primera hebra respectiva que tiene la complementariedad a dicha primera o segunda hebra.

Como se utiliza aquí, el término "hebra guía" se refiere a una hebra de un agente ARNi, por ejemplo, una hebra anticodificante de un dúplex siARN, que ingresa en el complejo RISC y dirige la división del mRNA objetivo.

Un "gen objetivo" es un gene cuya expresión se inhibe selectivamente o "silencia." Este silenciamiento se logra al dividir el mRNA del gen objetivo mediante un siARN o miARN, por ejemplo, un siARN o miARN que se crea de un precursor de ARN construido por ingeniería mediante un sistema de ARNi de la célula. Una porción o segmento de un elemento de dúplex del precursor de ARN es una hebra anticodificante que es complementaria, por ejemplo, suficientemente complementaria para activar la destrucción del mRNA objetivo deseado mediante la maquinaria o proceso de ARNi, en una sección de aproximadamente 18 a aproximadamente 40 o más nucleótidos del mRNA del
25 gen objetivo.

El término "construido por ingeniería," como un precursor de ARN construido por ingeniería, o una molécula de ácido nucleico construida por ingeniería, lo que indica que el precursor o molécula no se encuentra en la naturaleza, en que toda o una porción de la secuencia de ácido nucleico del precursor o molécula se crea o se selecciona por el hombre. Una vez creada o seleccionada, la secuencia se puede replicar, trasladar, transcribir, o de otra forma procesar dentro de una célula. Así, un precursor de ARN producido dentro de una célula de un transgen que incluye una molécula de ácido nucleico construida por ingeniería es un precursor de ARN construido por ingeniería.
35

Como se utiliza aquí, el término "asimetría", como en la asimetría de un dúplex siARN, se refiere a una desigualdad de la longitud de unión o resistencia de par base entre el terminal siARN (por ejemplo, entre nucleótidos terminales en una primera hebra y nucleótidos terminales en una segunda hebra opuesta), de tal manera que el extremo 5' de una hebra del dúplex está más frecuentemente en un estado no par transitorio, por ejemplo monocatenario, que el extremo 5' de la hebra complementaria. Esta diferencia estructural determina que una hebra del dúplex se incorpora preferencialmente en un complejo de RISC. La hebra cuyo extremo 5' es menor altamente apareado en la hebra complementaria se incorporará preferencialmente en RISC y media el ARNi.
40

Como se utiliza aquí, el término "la longitud de unión" o "resistencia de par base" se refiere a la longitud de la interacción entre pares de nucleótidos (o análogos de nucleótido) en hebras opuestas de un dúplex de oligonucleótido (por ejemplo, un dúplex siARN), debido principalmente a la unión de H, las interacciones Van der Waals, y similares entre dichos nucleótidos (o análogos de nucleótido).
45

Como se utiliza aquí, el "extremo 5'", como en el extremo 5' de una hebra anticodificante, se refiere a nucleótidos de Terminal 5', por ejemplo, entre uno y aproximadamente 5 nucleótidos en el terminal 5' de la hebra anticodificante. Como se utiliza aquí, el "extremo 3'", como en el extremo 3' de una hebra codificante, se refiere a la región, por ejemplo, una región de entre uno y aproximadamente 5 nucleótidos, que es complementaria con los nucleótidos del extremo 5' de la hebra anticodificante complementaria.
50

Como se utiliza aquí, el término "ARN aislado" (por ejemplo, "shARN aislado", "siARN aislado" o "agente ARNi aislado") se refiere a moléculas de ARN que son sustancialmente libres de otro material celular, o el medio de cultivo

cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libres de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetiza químicamente.

5 Como se utiliza aquí, el término "transgen" se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico, que se inserta mediante artificial en una célula, y llaga a ser parte del genoma del organismo que se desarrolla de la célula. Tal un
 10 transgen puede incluir un gen que es parcialmente o completamente heterólogo (es decir, extraño) en el organismo transgénico, o pueden representar un gen homólogo en un gen endógeno del organismo. El término "transgen" también significa una molécula de ácido nucleico que incluye una o más secuencias de ácido nucleico seleccionadas, por ejemplo, ADN, que codifican uno o más precursores de ARN contruidos por ingeniería, a ser expresados en un organismo transgénico, por ejemplo, animal, que es parcialmente o completamente o heterólogo, es decir, extraño, para el animal transgénico, u homólogo en un gen endógeno del animal transgénico, pero que se diseña para estar insertado en el genoma del animal en una ubicación que difiere de aquel del gen natural. Un transgen incluye uno o más promotores y cualquier otro ADN, tal como intrones, necesarios para la expresión de la secuencia de ácido micleico seleccionada, todos ligados operablemente a la secuencia seleccionada, y pueden incluir una secuencia mejoradora.

15 El término "in vitro" tiene su significado de técnica reconocida, por ejemplo, involucra reactivos o extractos purificados, por ejemplo, extractos celulares. El término "in vivo" tiene su significado de técnica reconocida, por ejemplo, que involucra células vivas, por ejemplo, células inmortalizadas, células primarias, estirpes celulares, y/o células en un organismo.

20 Un gen "involucrado" en un trastorno incluye un gen, la expresión normal o aberrante o función la cual afecta u origina una enfermedad o trastorno o por lo menos un síntoma de dicha enfermedad o trastorno.

Varias metodología de la actual invención incluye la etapa que involucra comparar un valor, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc. en un "control adecuado", denominado intercambiamente aquí como un "control adecuado". Un "control adecuado" o "control apropiado" es cualquier control o estándar familiar para una persona medianamente experta en la técnica útil para propósitos de comparación. En una realización, un "control adecuado" o "control apropiado" es un valor, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc. determinada antes de desarrollar una metodología ARNi, como se describe aquí. Por ejemplo, un índice de transcripción, nivel de mARN, índice de traducción, nivel de proteína, actividad biológica, característica o propiedad celular, genotipo, fenotipo, etc. se puede determinar antes de introducir un agente ARNi de la invención en una célula u organismo. En otra realización, a "control adecuado" o "control apropiado" es un valor, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc. determinado en una célula u organismo, por ejemplo, una célula u organismo de control o normal, que exhibe, por ejemplo, rasgos normales. En todavía otra realización, un "control adecuado" o "control apropiado" es un valor predefinido, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc.

Varios aspectos de la invención se describen en detalle adicional en las siguientes subsecciones.

I. Moléculas y agentes de ARN

35 La presente invención caracteriza "molécula de interferencia pequeña de ARN" ("moléculas de siARN" o "siARN"), métodos para elaborar dichas moléculas y métodos siARN (por ejemplo, métodos de investigación y/o terapéuticos) para utilizar dichas moléculas de siARN. Una molécula de siARN de la invención es un dúplex consistente de una hebra codificante y complementaria a la hebra anticodificante, la hebra anticodificante tiene suficiente complementariedad en un mARN objetivo para mediar el ARNi. Preferiblemente, las hebras se alinean de tal manera que existen por lo menos 1, 2, o 3 bases en el extremo de las hebras que no alinean (es decir, para lo cual no ocurre bases complementarias en la hebra opuesta) de tal manera que una suspensión de los residuos 1,2 o 3 ocurre en uno o ambos extremos del dúplex cuando las hebras se hibrida. Preferiblemente, la molécula siARN tiene una longitud de aproximadamente 10-50 o más nucleótidos, es decir, cada hebra comprende 10-50 nucleótidos (o análogos de nucleótido). Más preferiblemente, la molécula siARN tiene una longitud de aproximadamente 15-45 o
 45 15-30 nucleótidos. Aún más preferiblemente, la molécula siARN tiene una longitud de aproximadamente 16-25 o 18-23 nucleótidos. Las moléculas de siARN de la invención tienen adicionalmente una secuencia que es "suficientemente complementaria" a una secuencia mARN objetivo para dirigir la interferencia de ARN específica objetivo (ARNi), como se define aquí, es decir, el siARN tiene una secuencia suficiente para activar la destrucción del mARN objetivo mediante la maquinaria o proceso ARNi.

50 Los siARN caracterizados en la invención proporcionan especificidad y eficacia mejorada para mediar la división mediada por RISC de un gen objetivo deseado. En el aspecto preferido, la resistencia de par base entre el extremo 5' de la hebra anticodificante (AS 5') y el extremo 3' de la hebra codificante (S 3') de los siARN es menor que la longitud de unión o resistencia de par base entre el extremo 3' de la hebra anticodificante (AS 3') y el extremo 5' de la hebra codificante (S '5), de tal manera que la hebra anticodificante guía preferiblemente la división de un mARN objetivo. En una realización, la longitud de unión o resistencia de par base es menor debido a pocos pares base G:C entre el extremo 5' de la primera o la hebra anticodificante y el extremo 3' de la segunda o la hebra codificante que entre el extremo 3' de la primera o la hebra anticodificante y el extremo 5' de la segunda o la hebra codificante.

5 En otra realización, la longitud de unión o resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base de emparejamiento incorrecto entre el extremo 5' de la primera o la hebra anticodificante y el extremo 3' de la segunda o la hebra codificante. Preferiblemente, el par base de emparejamiento incorrecto se selecciona del grupo que consiste de G:A, C:A, C:U, G:G, A:A, C:C y U:U. En una realización relacionada, la longitud de unión o resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base oscilante, por ejemplo, G:U, entre el extremo 5' de la primera o la hebra anticodificante y el extremo 3' de la segunda o la hebra codificante.

En todavía otra realización, la longitud de unión o resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base que comprende un nucleótido raro, por ejemplo inosina (I). Preferiblemente, el par base se selecciona del grupo que consiste de un I:A, I:U y I:C.

10 En todavía otra realización, la longitud de unión o resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base que comprende un nucleótido modificado. En realizaciones preferidas, el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste de 2-amino-G, 2-amino-A, 2,6-diamino-G, y 2,6-diamino-A.

15 En general, se prefiere el siARN que contiene las secuencias de nucleótido suficientemente idénticas a una porción del gen objetivo para efectuar la división mediante RISC del gen objetivo. La identidad de secuencia 100% entre el siARN y el gen objetivo no se requiere para practicar la presente invención. La invención tiene la ventaja de ser capaces de tolerar las variaciones de secuencia preferidas de los métodos y composiciones de la invención con el fin de mejorar la eficiencia y especificidad del ARNi. Por ejemplo, las secuencias siARN con inserciones, eliminaciones, y mutaciones de punto único con relación a la secuencia objetivo también pueden ser efectivas para inhibición. Alternativamente, las secuencias siARN con sustituciones o inserciones de análogo de nucleótido pueden ser efectivas para inhibición.

20 La identidad de secuencia se puede determinar mediante comparación de secuencia o algoritmos de alineación conocidos en la técnica. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico (o de dos secuencias de aminoácido), las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptimos (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la primera secuencia o la segunda secuencia para alineación óptima). Las posiciones de nucleótidos (o residuos de aminoácido) en el nucleótido correspondiente (o aminoácido) luego de comparan. Cuando se ocupa una posición en la primera secuencia por el mismo residuo como la posición correspondiente en la segunda secuencia, luego las moléculas son idénticas en aquella posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas presentadas por la secuencias (es decir, % de homología = # de posiciones idénticas/ total # de posiciones x 100), que penalizan opcionalmente la clasificación para el número de espacios introducidos y/o la longitud de los espacios introducidos.

25 La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias se lleva a cabo utilizando un algoritmo matemático. En una realización, la alineación generada sobre una cierta porción de la secuencia alineada tiene suficiente identidad pero no sobre porciones que tienen bajo grado de identidad (es decir, una alineación local). Un ejemplo no limitante preferido de un algoritmo de alineación local utilizado para la comparación de las secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77. Tal un algoritmo se incorpora en programas BLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10.

35 En otra realización, la alineación se optimiza al introducir espacios apropiados y el porcentaje de identidad se determina sobre la longitud de las secuencias alineadas (es decir, una alineación espaciada). Para obtener alineaciones espaciadas para propósitos de comparación, se puede utilizar BLAST espaciados como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. En otra realización, la alineación se optimiza al introducir espacios apropiados y el porcentaje de identidad se determina sobre la longitud completa de las secuencias alineadas (es decir, una alineación global). Un ejemplo no limitante preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación global de las secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Tal un algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del empaque de software de alineación de secuencia GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar las secuencias de aminoácido, una tabla de residuo de peso PAM120, una penalidad de longitud de espacio de 12, y se puede utilizar una penalidad espacio de 4.

40 Más que 80% de identidad de secuencia, por ejemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o aún 100% identidad de secuencia, entre la hebra anticodificante siARN y se prefiere la porción del gen objetivo. Alternativamente, el siARN se puede definir funcionalmente como una secuencia de nucleótido (o secuencia de oligonucleótido) que es capaz de hibridar con una porción del transcripto de gen objetivo (por ejemplo, 400 mM de NaCl, 40 mM de PIPES pH 6.4, 1 mM de EDTA, 50°C o 70°C de hibridación durante 12-16 horas; seguido por lavado). Las condiciones de hibridación adicionales incluyen hibridación a 70°C en 1xSSC o 50°C en 1xSSC, 50% de formamida seguido por lavado a 70°C en 0.3xSSC o hibridación a 70°C en 4xSSC o 50°C en 4xSSC, 50% de formamida seguido por lavado por 67°C en 1xSSC. La temperatura de hibridación para los híbridos se anticipa por ser menos que 50 pares base en longitud debe ser 5-10°C menos que la temperatura de ebullición (Tm) del híbrido, en donde el Tm se determina de acuerdo con las

siguientes ecuaciones. Para híbridos menores a 18 pares base en longitud, $T_m(^{\circ}\text{C}) = 2(\# \text{ de A + T bases}) + 4(\# \text{ de G + C bases})$. Para híbridos entre 18 y 49 pares base en longitud, $T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\% \text{G+C}) - (600/\text{N})$, en donde N es el número de bases en el híbrido, y $[\text{Na}^+]$ es la concentración de iones de sodio en el amortiguador de hibridación ($[\text{Na}^+]$ para $1 \times \text{SSC} = 0.165 \text{ M}$). Ejemplos adicionales de condiciones exigentes para la hibridación del polinucleótido se proporcionan en Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, capítulos 9 y 11, y *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, F.M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4. La longitud de las secuencias de nucleótido idénticas puede ser por lo menos aproximadamente 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 27, 30, 32, 35, 37, 40, 42, 45, 47 o 50 bases.

10 Las moléculas de ARN de la presente invención se pueden modificar para mejorar la estabilidad en suero o en el medio de crecimiento en cultivos celulares. Con el fin de mejorar la estabilidad, los residuos 3' se pueden estabilizar contra la degradación, por ejemplo, ellos se pueden seleccionar de tal manera que ellos consisten de nucleótidos purina, particularmente nucleótidos adenosina o guanosina. Alternativamente, la sustitución de los nucleótidos pirimidina mediante análogos modificados, por ejemplo, sustitución de uridina mediante 2'-deoxitimidina se tolera y
15 no afecta la eficiencia de la interferencia de ARN.

En un aspecto preferido, la invención caracteriza ARN de interferencia pequeña (siARN) que incluyen una hebra codificante y una hebra anticodificante, en donde la hebra anticodificante tiene una secuencia suficientemente complementaria a una secuencia mRNA objetivo para dirigir la interferencia de ARN específica objetivo (ARNi) y en donde la hebra codificante y/o la hebra anticodificante se modifica mediante la sustitución de nucleótidos internos con nucleótidos modificados, de tal manera que la estabilidad in vivo se mejora cuando se compara con un siARN no modificado correspondiente. Como se define aquí, un nucleótido "interno" es uno que ocurre en cualquier posición diferente al extremo 5' o el extremo 3' de la molécula de ácido nucleico, polinucleótido o oligonucleótido. Un nucleótido interno puede estar dentro de una molécula monocatenaria o dentro de una hebra de una molécula dúplex o bicatenaria. En una realización, la hebra codificante y/o la hebra anticodificante se modifica mediante la sustitución de por lo menos un nucleótido interno. En otra realización, la hebra codificante y/o la hebra anticodificante se modifica mediante la sustitución de por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más nucleótidos internos. En otra realización, la hebra codificante y/o la hebra anticodificante se modifica mediante la sustitución de por lo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más de los nucleótidos internos. En todavía otra realización, la hebra codificante y/o la hebra anticodificante se modifica mediante la sustitución de todos los nucleótidos internos.

En una realización preferida de la presente invención la molécula de ARN puede contener por lo menos un análogo de nucleótido modificado. Los análogos de nucleótido se pueden ubicar en las posiciones en donde la actividad específica objetivo, por ejemplo, el ARNi que media la actividad no se afecta sustancialmente, por ejemplo, en una región en el extremo 5' y/o el extremo 3' de la molécula de ARN. Particularmente, los extremos se pueden establecer al incorporar los análogos de nucleótido modificados.

Los análogos de nucleótido preferidos incluyen azúcar- y/o ribonucleótidos modificados por la estructura (es decir, incluyen modificaciones para la estructura de azúcar fosfato). Por ejemplo, los fosfodilípidos de éster de ARN natural se pueden modificar al incluir por lo menos un heteroátomo de nitrógeno o azufre. En ribonucleótidos modificados por la estructura preferidos el grupo fosfoéster que se conecta a los ribonucleótidos adyacentes se reemplaza por un grupo modificado, por ejemplo, del grupo fosfotioato. En ribonucleótidos modificados por azúcar preferidos, el grupo 2' OH se reemplaza por un grupo seleccionado de H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ o ON, en donde R es alquilo C₁-C₆, alqueno o alquino y halo es F, Cl, Br o I.

También se prefieren ribonucleótidos modificados por nucleobase, es decir, ribonucleótidos, que contienen por lo menos una nucleobase de ocurrencia no natural en lugar de de una nucleobase de ocurrencia natural. Se pueden modificar las bases para bloquear la actividad de de adenosina desaminasa. Las nucleobases modificadas de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, uridina y/o citidina modificada en la posición 5, por ejemplo, 5-(2-amino)propil uridina, 5-bromo uridina; adenosina y/o guanosinas modificadas en la posición 8, por ejemplo, 8-bromo guanosina; nucleótidos deaza, por ejemplo, 7-deaza-adenosina; nucleótidos O- y N-alquilados, por ejemplo, son adecuados N6-metil adenosina. Se debe notar que se pueden combinar las modificaciones anteriores.

El ARN se puede producir enzimáticamente o mediante síntesis orgánica parcial/total, cualquier ribonucleótido modificado se puede introducir mediante síntesis enzimática u orgánica in vitro. En una realización, un agente ARNi se prepara químicamente. Los métodos para sintetizar a las moléculas de ARN se conocen en la técnica, en particular, los métodos de síntesis química como se describe en Verma y Eckstein (1998) *Annul Rev. Biochem.* 67:99-134. En otra realización, se prepara un ss-siARN enzimáticamente. Por ejemplo, se puede preparar un ds-siARN mediante procesamiento enzimático de un ARN largo que tiene suficiente complementariedad al mRNA objetivo deseado. El procesamiento largo de ARN se puede llevar a cabo in vitro, por ejemplo, utilizando los lisatos celulares apropiados y los ds-siARN se pueden purificar posteriormente mediante electroforesis de gel o filtración de gel. El ds-siARN luego se puede desnaturar de acuerdo con las metodologías reconocidas en la técnica. En una

realización de ejemplo, el ARN se puede purificar a partir de una mezcla mediante extracción con un disolvente o resina, precipitación, electroforesis, cromatografía, o una combinación de estos. Alternativamente, el ARN se puede utilizar sin o con un mínimo de purificación para evitar las pérdidas debido al procesamiento de la muestra. Alternativamente, el siARN también se puede prepara mediante transcripción enzimática de plantillas de ADN
 5 sintéticas o de plásmidos de ADN aislados de bacterias recombinantes. Típicamente, las polimerasas de ARN de fago se utilizan tal como polimerasa de ARN T7, T3 o SP6 (Milligan and Uhlenbeck (1989) Methods Enzymol. 180:51-62). El ARN se puede secar para almacenamiento o se disuelve en una solución acuosa. La solución puede contener amortiguadores o sales para inhibir la hibridación, y/o promover la estabilización de las hebras únicas.

En una realización, el mRNA objetivo de la invención especifica la secuencia de aminoácido de una proteína celular
 10 (por ejemplo, una proteína asociada con membrana nuclear, citoplásmica, o transmembrana). En otra realización, el mRNA objetivo de la invención especifica la secuencia de aminoácido de una proteína extracelular (por ejemplo, una matriz de proteína extracelular o proteína secretada). Como se utiliza aquí, la frase "secuencia de aminoácido específica" de una proteína significa que la secuencia de mRNA se traslada en la secuencia de aminoácido de acuerdo con las reglas del código genético. Las siguientes clases de proteínas se listan para propósitos ilustrativos:
 15 proteínas desarrolladas (por ejemplo, moléculas de adhesión, inhibidores quinasa ciclina, miembros de la familia Wnt, miembros de la familia Pax, miembros de la familia de hélice Winged, miembros de la familia Hox, citoquinas/linfocinas y sus receptores, factores de crecimiento/diferenciación y sus receptores, neurotransmisores y sus receptores); proteínas codificadas por oncogen (por ejemplo, ABLI, BCL1, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSFIR, ERBA, ERBB, EBRB2, ETSI, ETSI, ETV6, FGR, FOS, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS, PIM I, PML, EP 1 633 890 B1 13 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 RET, SRC, TALI, TCL3, y YES); proteínas supresoras de tumor (por ejemplo, APC, BRCA1, BRCA2, MADH4, MCC, NF I, NF2, RB I, TP53, y WTI); y enzimas (por ejemplo, sintasas y oxidasas ACC, desaturasas ACP e hidroxilasas, pirofosforilasas de glucosa ADP, ATPasas, deshidrogenasas de alcohol, amilasas, amiloglucosidasas, catalasas, celulasas, chalcone sintasas, chitinasas, ciclooxigenasas, decarboxilasas, dextrinasas, polimerasas de ADN y ARN,
 20 galactosidasas, glucanasas, glucosa oxidasas, sintasas de almidón unidas a gránulo, GTPasas, helicasas, hemicelulasas, integrasas, inulinasas, invertasas, isomerasas, quinasas, lactasas, lipasas, lipoxigenasas, lisozimas, sintasas nopalina, sintasas octopina, pectinesterasas, peroxidasas, fosfatasas, fosfolipasas, fosforilasas, fitasas, sintasas reguladores del crecimiento de plantas, poligalacturonasas, proteinasas y peptidasas, pulanasas, recombinasas, transcriptasas inversos, RUBISCO, topoisomerasas, y xilanasas).

En un aspecto preferido de la invención, la molécula de mRNA objetivo de la invención especifica la secuencia de aminoácido de una proteína asociada con una condición patológica. Por ejemplo, la proteína puede ser una proteína asociada a patógeno (por ejemplo, una proteína vírica involucrada en la inmunosupresión del anfitrión, replicación del patógeno, transmisión del patógeno, o mantenimiento de la infección), o una proteína anfitriona que facilita la entrada del patógeno dentro del anfitrión, el metabolismo del fármaco mediante el patógeno o el anfitrión, replicación
 30 o integración del genoma del patógeno, establecimiento o rociado de la infección en el anfitrión, o montaje de la siguiente generación de patógeno. Alternativamente, la proteína puede ser una proteína asociada con tumor o una proteína asociada con enfermedad autoinmune.

En una realización, la molécula de mRNA objetivo de la invención especifica la secuencia de aminoácido de una proteína endógena (es decir, una proteína presente en el genoma de una célula u organismo). En otra realización, la molécula de mRNA objetivo de la invención especifica la secuencia de aminoácido de una proteína heteróloga expresada en una célula recombinante o un organismo alterado genéticamente. En otra realización, la molécula de mRNA objetivo de la invención especifica la secuencia de aminoácido de una proteína codificada por un transgen (es decir, una construcción de gen insertada en un sitio ectópico en el genoma de la célula). En todavía otra
 40 realización, la molécula de mRNA objetivo de la invención especifica la secuencia de aminoácido de una proteína codificada por un genoma de patógeno que es capaz de infectar una célula o un organismo del cual se deriva la célula.

Al inhibir la expresión de tales proteínas, se puede obtener información valiosa con respecto a la función de dichas proteínas y beneficios terapéuticos que se pueden obtener de dicha inhibición.

En una realización, se sintetizan siARN in vivo, in situ, o in vitro. La polimerasa de ARN endógena de la célula puede mediar la transcripción in vivo o in situ, o se puede utilizar polimerasa de ARN clonada para transcripción in vivo o in vitro. Para la transcripción de un transgen in vivo o una construcción de expresión, una región reguladora (por ejemplo, promotor, mejorador, silenciador, donante o aceptor de división, poliadenilación) se puede utilizar para transcribir el ss-siARN. La inhibición se puede objetivar mediante transcripción específica en un órgano, tejido, o tipo de célula; la estimulación de una condición ambiental (por ejemplo, infección, tensión, temperatura, inductores
 50 químicos); y/o transcripción construida por ingeniería en una etapa o edad desarrollada. Un organismo transgénico que expresa ss-siARN de una construcción recombinante se puede producir al introducir la construcción en un cigoto, una célula madre embrionica, u otra célula multipotente derivada del organismo apropiado.

II. ARN de horquilla pequeña (shARN)

En ciertas realizaciones características, la actual invención proporciona shARN que tienen especificidad o eficacia mejorada en mediar ARNi. En contraste a los dúplex siARN cortos, los ARN de horquilla pequeña (shARN) imitan los precursores naturales de los miARN e ingresan en la parte superior de la ruta ARNi. Por esta razón, se considera que los shARN median ARNi más eficientemente al ser cargado a través de la ruta de ARNi natural completa.

5 Un shARN preferido de la invención es uno que se ha rediseñado para especificidad o mejoramiento incrementado con relación al shARN previo. El nuevo shARN difiere de un shARN previo en aquel un dúplex siARN producido del nuevo shARN que tiene menor resistencia de par base entre el extremo 5' de la hebra anticodificante o la primera hebra y el extremo 3' de la hebra codificante o segunda hebra que la resistencia de par base entre el extremo 3' de la hebra anticodificante o la primera hebra y el extremo 5' de la hebra codificante o segunda hebra.

10 1. Precursores de ARN Construidos por Ingeniería que Generan los siARN

Los precursores de mARN de ocurrencia natural (pre-miARN) tiene una única hebra que forma un tallo dúplex que incluye dos porciones que son generalmente complementarias, y un bucle, que se conecta a las dos porciones del tallo. En los premiARN típicos, el tallo incluye una o más protuberancias, por ejemplo, nucleótidos extra que crean un único nucleótido "bucle" en una porción del tallo, y/o uno o más nucleótidos no apareados que crean un espacio en la hibridación de las dos porciones del tallo en cada uno. Los ARN de horquilla pequeña, o los precursores de ARN
15 construidos por ingeniería, de la invención son construcciones artificiales basadas en estos pre-miARN de ocurrencia natural, pero que se construyen por ingeniería para suministrar los siARN deseados.

En los shARN, o los precursores de ARN construidos por ingeniería, de la presente invención, una porción del tallo dúplex es una secuencia de ácido nucleico que es complementaria (o anticodificante) al mARN objetivo. Así, los
20 precursores de ARN construidos por ingeniería incluyen un tallo dúplex con dos porciones y un bucle que conecta las dos porciones de tallo. Las dos porciones de tallo son aproximadamente 18 o 19 a aproximadamente 25, 30, 35, 37, 38, 39, o 40 o más nucleótidos en longitud. Cuando se utiliza en células de mamífero, la longitud de las porciones de tallo deben ser menores de aproximadamente 30 nucleótidos para evitar provocar respuestas no específicas como la ruta interferón. En células de no mamífero, el tallo puede ser más largo que 30 nucleótidos. De
25 hecho, el tallo puede incluir secciones mucho más largas complementarias al mARN objetivo (hasta, e incluyendo el mARN completo). Las dos porciones del tallo dúplex pueden ser suficientemente complementarias para hibridar para formar el tallo dúplex. Así, las dos porciones pueden ser, pero no necesitan ser, completamente o perfectamente complementarias. Adicionalmente, las dos porciones de tallo pueden tener la misma longitud, o una porción puede incluir una suspensión de 1, 2, 3, o 4 nucleótidos. Los nucleótidos suspendidos pueden incluir, por ejemplo, uracilos (Us), por ejemplo, todos los Us. El bucle en los shARN o los precursores de ARN construidos por ingeniería puede
30 diferir de las secuencias naturales pre-miARN al modificar la secuencia de bucle para incrementar o reducir el número de nucleótidos pares, o reemplazar toda o parte de la secuencia de bucle con tetrabucle u otras secuencias de bucle. Así, el bucle en los shARN o los precursores de ARN construidos por ingeniería puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más, por ejemplo, 15 o 20, o más nucleótidos en longitud.

35 Los shARN de la invención incluyen las secuencias del dúplex siARN deseado. El dúplex siARN deseado, y así ambas de las dos porciones de tallo en el precursor de ARN construido por ingeniería, se seleccionan mediante métodos conocidos en la técnica. Estas incluyen, pero no se limitan a, seleccionar un nucleótido 18, 19, 20, 21, o más, secuencia del gen objetivo de secuencia de mARN de una región 100 a 200 o 300 nucleótidos en el lado 3' desde el inicio de la traducción. En general, la secuencia se puede seleccionar de cualquier porción del mARN del
40 gen objetivo, tal como el 5' UTR (región no traducida), que codifica la secuencia, o 3' UTR. Esta secuencia puede seguir opcionalmente inmediatamente después de una región del gen objetivo que contiene dos nucleótidos adyacentes AA. Los últimos dos nucleótidos del 21 o la secuencia de nucleótido se puede seleccionar por ser UU (ya que la hebra anticodificante del siARN empieza con UU). Este 21 o la secuencia de nucleótido se utiliza para crear una porción de un tallo dúplex en el precursor de ARN construido por ingeniería. Esta secuencia puede
45 reemplazar una porción de tallo de una secuencia pre-stRNA tipo natural, por ejemplo, enzimáticamente, o se incluye en una secuencia completa que se sintetiza. Por ejemplo, uno puede sintetizar oligonucleótidos de ADN que codifican el precursor de ARN construido por ingeniería tallo-bucle completo, o que codifican justo la porción a ser insertada en el tallo dúplex del precursor, y utilizando las enzimas de restricción construyen el precursor de ARN construido por ingeniería, por ejemplo, de un pre-stRNA tipo natural.

50 Los precursores de ARN construidos por ingeniería se incluyen en el tallo dúplex el 21-22 o las secuencias de nucleótido del siARN deseadas para ser producidas in vivo. Así, la porción de tallo del precursor de ARN construido por ingeniería incluye por lo menos 18 o 19 pares de nucleótido que corresponden a la secuencia de una porción exónica del gen cuya expresión se reduce o se inhibe. Los dos nucleótidos 3' que flanquean esta región del tallo se seleccionan con el fin de maximizar la producción del siARN del precursor de ARN construido por ingeniería, y para
55 maximizar la eficacia del siARN resultante en objetivar el mARN correspondiente para destrucción mediante ARNi in vivo e in vitro.

Otro rasgo de definición de estos precursores de ARN construidos por ingeniería es que como una consecuencia de esta longitud, la secuencia, y/o estructura, no inducen las respuestas no específicas de secuencia, tal como la

inducción de la respuesta o apoptosis de interferón, o que ellos inducen un nivel inferior de tales respuestas no específicas de secuencia de ARN bicatenario largo (>150bp) que se ha utilizado para inducir el ARNi. Por ejemplo, la respuesta de interferón se activa mediante dsARN más largo que 30 pares base.

2. Transgenes que Codifican los Precusores de ARN construidos por ingeniería

- 5 Los nuevos precusores de ARN construidos por ingeniería se pueden sintetizar mediante métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de sintetizador de ADN automático (tal como los comercialmente disponibles por Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Estos precusores de ARN construidos por ingeniería, sintéticos se pueden utilizar directamente como se describe adelante o se clonan en los vectores de expresión mediante métodos conocidos en el campo. Los precusores de ARN construidos por ingeniería se deben
- 10 suministrar a las células in vitro o in vivo en el que se desea objetivar un mARN específico para destrucción. Un número de métodos se han desarrollado para el suministro de ADN o ARN a las células. Por ejemplo, para el suministro in vivo, las moléculas se pueden inyectar directamente en un sitio de tejido o se administran sistémicamente. El suministro in vitro incluye los métodos conocidos en la técnica tal como electroporación y lipofección.
- 15 Para alcanzar las concentraciones intracelulares de la molécula de ácido nucleico suficiente para suprimir la expresión de los mARN endógenos, uno puede utilizar, por ejemplo, una construcción de ADN recombinante en la que el oligonucleótido se coloca bajo el control de un Pol III fuerte (por ejemplo, promotor de ARN U6 o PolIII H1) o promotor Pol II. El uso de tal una construcción para transfectar células objetivo in vitro o in vivo resultará en la construcción suficiente de cantidades del precursor de ARN construido por ingeniería que conduce a la producción
- 20 de un siARN que puede objetivar una secuencia de mARN correspondiente para la división mediante ARNi para reducir la expresión del gen que codifica aquel mARN. Por ejemplo, un vector se puede introducir in vivo de tal manera que este se toma por una célula y dirige la transcripción mediante un precursor de ARN construido por ingeniería. Tal un vector puede permanecer episómico o se llega a integrar cromosómicamente, tanto como este se puede transcribir para producir el precursor stRNA deseado.
- 25 Tales vectores se pueden construir mediante métodos de tecnología de ADN recombinante conocidos en la técnica. Los vectores pueden ser plásmidos, víricos, u otros vectores conocidos en la técnica tal como aquellos descritos aquí, utilizados para replicación y expresión en células de mamífero u otros tipos de células objetivo. Las secuencias de ácido nucleico que codifican los precusores de ARN construidos por ingeniería se pueden preparar utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, dos oligonucleótidos de ADN sintéticos se pueden sintetizar para crear un gen
- 30 novedoso que codifica el precursor de ARN construido por ingeniería completo. Los oligonucleótidos de ADN, que serán pares, que serán "extremos pegajosos" apropiados para clonación, se pueden insertar en un sitio de restricción en un plásmido que contiene una secuencia promotora (por ejemplo, un promotor Pol II o a Pol III) y las secuencias terminadoras apropiadas 3' para las secuencias de precursor de ARN construido por ingeniería (por ejemplo, una secuencia de señal de división y poliadenilación de SV40 o una secuencia terminadora Pol III).
- 35 La invención también abarca células anfitrionas construidas genéticamente por ingeniería que contiene cualquiera de los vectores de expresión anteriores y que por lo tanto expresan las moléculas de ácido nucleico de la invención en la célula anfitriona. Las células anfitrionas se pueden cultivar utilizando técnicas y métodos conocidos (ver, por ejemplo, Culture of Animal Cells (R.I. Freshney, Alan R. Liss, Inc. 1987); Molecular Cloning, Sambrook et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)).
- 40 La introducción exitosa de los vectores de la invención en las células anfitrionas se puede monitorear utilizando varios métodos conocidos. Por ejemplo, la transfección transitoria se puede señalar con un reportero, tal como un marcador fluorescente, tal como Proteína Fluorescente Verde (GFP). La transfección estable se puede indicar utilizando marcadores que proporcionan la célula transfectada con resistencia a factores ambientales específicos (por ejemplo, antibióticos y fármacos), tal como resistencia a la higromicina B, por ejemplo, en células de insecto y
- 45 en células de mamífero.

3. Secuencias Reguladoras

- La expresión de los precusores de ARN construidos por ingeniería se conduce mediante las secuencias reguladoras, y los vectores de la invención pueden incluir cualesquier secuencias reguladoras conocidas en la técnica para actuar en células de mamífero, por ejemplo, células de humano o murino; en células de insecto; en
- 50 células de planta; o en otras células. El término secuencia reguladora incluye promotores, mejoradores, y otros elementos que controlan la expresión. Se apreciará que la secuencia reguladora apropiada depende de tales factores como el uso futuro de la célula o animal transgénico en el que una secuencia que codifica un precursor de ARN construido por ingeniería se introduce, y el nivel de expresión del precursor de ARN deseado. Una persona experta en la técnica será capaz de seleccionar la secuencia reguladora apropiada. Por ejemplo, los animales
- 55 transgénicos descritos aquí se pueden utilizar para determinar el papel del polipéptido de prueba o los precusores de ARN construidos por ingeniería en un tipo de célula particular, por ejemplo, una célula hematopoyética. En este caso, una secuencia reguladora que conduce la expresión del transgen ubicua, o se puede utilizar una secuencia

reguladora específica hematopoyética que expresa el transgen solo en células hematopoyéticas. La expresión de los precursores de ARN construidos por ingeniería en una célula hematopoyética significa que la célula es ahora susceptible al ARNi objetivo específico de un gen particular. Ejemplos de varias secuencias reguladoras se describen adelante.

- 5 Las secuencias reguladoras pueden ser inducibles o constitutivas. Las secuencias reguladoras constitutivas adecuadas incluyen la secuencia reguladora de un gen constitutivo tal como la secuencia reguladora α -actina, o puede ser de origen vírico tal como las secuencias reguladoras derivadas de virus de tumor mamario de ratón (MMTV) o citomegalovirus (CMV).

- 10 Alternativamente, la secuencia reguladora puede dirigir la expresión de transgen en órganos o tipos de células específicos (ver, por ejemplo, Lasko et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232). Varias secuencias reguladoras específicas de tejido se conocen en la técnica incluyendo la secuencia reguladora de albúmina para el hígado (Pinkert et al., 1987, Genes Dev. 1:268276); la secuencia reguladora de endotelina para células endoteliales (Lee, 1990, J. Biol. Chem. 265:10446-50); la secuencia reguladora de queratina para epidermis; la secuencia reguladora de la cadena 2 liviana de miosina para el corazón (Lee et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:15875-85), y la
15 secuencia reguladora de insulina para el páncreas (Bucchini et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2511-2515), o la secuencia reguladora vav para las células hematopoyéticas (Oligvy et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:14943-14948). Otra secuencia reguladora adecuada, que dirige la expresión constitutiva de trans genes en células de origen hematopoyético, es la secuencia reguladora de murino MHC clase I (Morello et al., 1986, EMBO J. 5:1877-1882). Debido a que la expresión de NMC se induce por las citoquinas, la expresión de un gen de prueba
20 unido operablemente a esta secuencia reguladora se puede sobrerregular en la presencia de las citoquinas.

- Adicionalmente, la expresión del transgen se puede regular precisamente, por ejemplo, al utilizar una secuencia reguladora inducible y sistemas de expresión tal como una secuencia reguladora que es sensible a ciertos reguladores fisiológicos, por ejemplo, niveles de glucosa circulantes, o hormonas (Docherty et al., 1994, FASEB J. 8:20-24). Tales sistemas de expresión inducibles, adecuados para el control de la expresión de transgen en células
25 o en mamíferos tal como ratones, incluyen regulación mediante ecdisona, mediante estrógeno, progesterona, tetraciclina, inductores químicos de dimerización, y isopropil-beta-D1 - tiogalactopiranosida (IPTG) (denominado colectivamente como "la molécula reguladora"). Cada uno de estos sistemas de expresión se describirá bien en la literatura y permite la expresión del transgen a través del animal en una forma controlada por la presencia o ausencia de la molécula reguladora. Para una revisión de sistemas de expresión inducibles, ver, por ejemplo, Mills,
30 2001, Genes Devel. 15:1461-1467, y las referencias citadas allí.

- Los elementos reguladores referidos anteriormente incluyen, pero no se limitan a, el gen temprano inmediato citomegalovirus hCMV, los promotores tempranos o tardíos de adenovirus SV40 (Bernoist et al., Nature, 290:304, 1981), el sistema tet, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC, el sistema TRC, el operador principal y las
35 regiones promotoras de fago A, las regiones de control de la proteína cubierta fd, el promotor para la quinasa 3-fosfoglicerato, los promotores de ácido fosfatasa, y los promotores de los factores de acoplamiento α de levadura. Los promotores adicionales incluyen el promotor contenido en la repetición de Terminal largo 3' del virus de sarcoma Rous (Yamamoto et al., Cell 22:787-797, 1988); el promotor de quinasa timidita de herpes (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441, 1981); o las secuencias reguladoras del gen metalotioneina (Brinster et al., Nature 296:39, 1988).

40 4. Ensayo para Probar los Precursores de ARN Construidos por Ingeniería

- Se pueden utilizar lisatos de embrión *Drosophila* para determinar si un precursor de ARN construido por ingeniería es, de hecho, el precursor directo de un stRNA maduro o siARN. Este ensayo de lisato se describe en Tuschl et al., 1999, supra, Zamore et al., 2000, supra, y Hutvdgner et al. 2001, supra. Estos lisatos recapitulan el ARNi in vitro, permitiendo así la investigación en el ARN precursor propuesto se divide en un stRNA maduro o siARN mediante
45 un mecanismo similar a ARNi. En resumen, el ARN precursor se incuba con el lisato de embrión *Drosophila* durante varios periodos, luego se ensaya para la producción del siARN maduro o stRNA mediante extensión de cebador o hibridación Northern. Como en la configuración, el ARN maduro se acumula en la reacción libre de célula. Así, un ARN que corresponde al precursor propuesto se puede mostrar para ser convertido en un stRNA maduro o dúplex siARN en el lisato de embrión *Drosophila*.

- 50 Adicionalmente, un precursor de ARN construido por ingeniería se puede probar funcionalmente en el lisato de embrión *Drosophila*. En este caso, el precursor de ARN construido por ingeniería se incuba en el lisato en la presencia de un mARN radiomarcado 5' objetivo en una reacción estándar ARNi in vitro para varias longitudes de tiempo. El mARN objetivo se puede radiomarcarse 5' utilizando guanilil transferasa (como se describe en Tuschl et al., 1999, supra y referencias allí) o otros métodos adecuados. Los productos de la reacción in vitro luego se aíslan y se
55 analizan en una archilamida desnaturalizada o gel de agarosa para determinar si el mARN objetivo se ha dividido en respuesta a la presencia del precursor de ARN construido por ingeniería en la reacción. EL grado y posición de tal división del objetivo mARN indicará si la construcción por ingeniería del precursor crea un pre-siARN capaz de mediar el ARNi específico de secuencia.

III. Métodos para introducir ARN, Vectores, y Células Anfitrionas

Los métodos físicos para introducir ácidos nucleicos incluyen la inyección de una solución que contiene el ARN, bombardeo de partículas cubiertas por el ARN, enjuague de la célula u organismo en una solución del ARN, o electroporación de las membranas celulares en la presencia del ARN. Un empaque de construcción vírica en una partícula vírica llevaría eficiente introducción de una construcción de expresión en la célula y transcripción del ARN codificado por la construcción de expresión. Se pueden utilizar otros métodos conocidos en la técnica para introducir ácidos nucleicos a las células, tal como transporte de portador mediado por lípido, transporte mediado por químico, tal como fosfato de calcio, y similares. Así el ARN se puede introducir junto con componentes que desarrollan una o más de las siguientes actividades: retoma de ARN mejorada mediante la célula, inhibir la hibridación de hebras únicas, estabilizar las hebras únicas, o de otra forma inhibición incrementada del gen objetivo.

El ARN se puede introducir directamente en la célula (es decir, intracelularmente); o se introduce extracelularmente en una cavidad, espacio intersticial, en la circulación de un organismo, introducir oralmente, o se puede introducir al bañar una célula u organismo en una solución que contiene el ARN. La circulación vascular o extravascular, la sangre o sistema linfático, y el fluido cerebroespinal son sitios en donde el ARN se puede introducir.

La célula con el gen objetivo se puede derivar de o contener en cualquier organismo. El organismo puede ser una planta, animal, protozoo, bacteria, virus, u hongo. La planta puede ser una monocotiledónea, dicotiledónea o gimnosperma; el animal puede ser un vertebrado o invertebrado. Los microbios preferidos son aquellos utilizados en la agricultura o en la industria, y aquellos que son patogénicos para plantas o animales. Los hongos incluyen organismos en las morfologías de levadura y moho. Las plantas incluyen arabidopsis; cultivos de campo (por ejemplo, la alfalfa, cebada, frijol, maíz, algodón, lino, guisante, colza, arroz, centeno, girasol, sorgo, soja, girasol, tabaco, y el trigo), los cultivos vegetales (por ejemplo, espárragos, remolacha, brócoli, repollo, zanahoria, coliflor, apio, pepino, berenjena, lechuga, cebolla, pimiento, papa, calabaza, rábano, espinaca, calabaza, malanga, tomate y calabacín), frutas y cultivos de nueces (por ejemplo, almendras, manzana, albaricoque, plátano, zarzamora, arándano, cacao, cereza, coco, arándano, feijoa, avellanas, uvas, pomelo, guayaba, kiwi, limón, lima, mango, melón, nectarina, naranja, papaya, maracuyá, durazno, maní, pera, piña, pistacho, ciruela, frambuesa, fresa, nuez, mandarina, y sandía), y plantas ornamentales (por ejemplo, aliso, fresno, álamo, azalea, abedul, boj, camelias, claveles, crisantemos, olmo, abeto, hiedra, jazmín, enebro, roble, palma, pino, álamo, secoya, rododendro, rosa, y caucho). Ejemplos de animales vertebrados incluyen pez, mamíferos, ganado, cabras, cerdos, ovejas, roedores, hámster, ratones, ratas, primates, y humano; los animales invertebrados incluyen nemátodos, otros gusanos, drosófila, y otros insectos.

El experto en la materia apreciará que los organismos enumerados también son útiles en practicar otros aspectos de la invención, por ejemplo, hacer organismos transgénicos como se describe infra.

La célula que tiene el gen objetivo puede ser de línea germinal o somática, totipotente o pluripotente, divisor o no divisor, parenquima o epitelio, inmortalizado o transformado, o similares. La célula puede ser una célula madre o una célula diferenciada. Los tipos de células que se diferencian incluyen adipocitos, fibroblastos, miocitos, cardiomiocitos, endotelio, neuronas, glanglios, células sanguíneas, megacariocitos, linfocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, leucocitos, granulocitos, queratinocitos, condrocitos, osteoblastos, osteoclastos, hepatocitos, y células de las glándulas endocrina o exocrina.

Dependiendo del gen objetivo particular la dosis de material de ARN bicatenario suministrado, este proceso puede proporcionar pérdida parcial o completa de la función para el gen objetivo. Una reducción o pérdida de la expresión de gen en por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% o más de las células objetivo es el ejemplo. La inhibición de la expresión de gen se refiere a la ausencia (o reducción observable) en el nivel de proteína y/o producto de mARN de un gen objetivo. La especificidad se refiere a la capacidad de inhibir el gen objetivo sin manifestar efectos en los otros genes de la célula. Las consecuencias de la inhibición se pueden confirmar mediante examen de las propiedades exteriores de la célula u organismo (como se presenta adelante en los ejemplos) o mediante técnicas bioquímicas tal como hibridación de solución de ARN, protección de nucleasa, hibridación Northern, transcripción inversa, monitoreo de expresión de gen con una microdisposición, unión de anticuerpo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), Western blot, radioinmunoensayo (RIA), otros inmunoensayos, y análisis de célula activada por fluorescencia (FACS).

Para inhibición mediada por ARN en la estirpe celular u organismo completo, la expresión de gen se evalúa convenientemente mediante el uso de un reportero o gen resistente al fármaco cuyo producto de proteína se evalúa fácilmente. Tales genes reporteros incluyen sintasa acetohidroxiácido (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta galactosidasa (LacZ), beta glucuronidasa (GUS), acetiltransferasa cloramfenicol (CAT), proteína verde fluorescente (GFP), peroxidasa de rábano (HRP), luciferasa (Luc), sintasa nopalina (NOS), sintasa octopina (OCS), y sus derivados. Están disponibles múltiples marcadores seleccionables que confieren resistencia a la ampicilina, bleomicina, cloramfenicol, gentamicina, higromicina, canamicina, lincomicina, metotrexato, fosfotricina, puromicina, y tetraciclina. Dependiendo del ensayo, la cuantificación de la cantidad de expresión de gen permite determinar un grado de inhibición que es mayor que 10%, 33%, 50%, 90%, 95% o 99% cuando se compara con una

célula no tratada de acuerdo con la presente invención. Las dosis inferiores de material inyectado y los tiempos más largos después de la administración de un agente ARNi pueden resultar en inhibición en una fracción de células más pequeña (por ejemplo, por lo menos 10%, 20%, 50%, 75%, 90%, o 95% de las células objetivo). La cuantificación de la expresión de gen en una célula puede mostrar cantidades similares de inhibición en el nivel de acumulación del mARN objetivo o traducción de la proteína objetivo. Como un ejemplo, la eficiencia de inhibición se puede determinar al evaluar la cantidad de producto de gen en la célula; se puede detectar el mARN con una sonda de hibridación que tiene una secuencia de nucleótido externa a la región utilizada para el ARN bicatenario inhibidor, o se puede detectar un polipéptido traducido con un anticuerpo elevado contra la secuencia de polipéptido de aquella región.

El ARN se puede introducir en una cantidad que permite el suministro de por lo menos una copia por célula. Las dosis mayores (por ejemplo, por lo menos 5, 10, 100, 500 o 1000 copias por célula) de material pueden producir inhibición más efectiva; las dosis más bajas también pueden ser útiles para aplicaciones específicas.

IV. Métodos de Tratamiento:

Se caracterizan aquí métodos profilácticos y terapéuticos para tratar un sujeto en riesgo de (o susceptible a) un trastorno o que tiene un trastorno asociado con expresión o actividad de gen objetivo no esperada o aberrante. "Tratamiento", o "tratar" como se utiliza aquí, se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico (por ejemplo, un agente ARNi o vector o transgen que codifica el mismo) a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido aislado o estirpe celular de un paciente, quien tiene una enfermedad o trastorno, un síntoma de enfermedad o trastorno o una predisposición hacia una enfermedad o trastorno, con el propósito de curar, mantener, aliviar, mejorar, alterar, remediar, disminuir, mejorar o afectar la enfermedad o trastorno, los síntomas de la enfermedad o trastorno, o la predisposición hacia la enfermedad.

Con respecto a los métodos terapéuticos o profilácticos de tratamiento, tales tratamientos se pueden modificar o adaptar específicamente, con base en el conocimiento obtenido del campo de los farmacogenómicos. "Farmacogenómicos", como se utiliza aquí, se refiere a la aplicación de tecnologías genómicas tal como secuenciamiento de gen, genéticas estadísticas, y análisis de expresión de gen en fármacos en el desarrollo clínico y en el mercado. Más específicamente, el término se refiere al estudio de cómo un gen de un paciente determina su respuesta a un fármaco (por ejemplo, un "fenotipo de respuesta de fármaco" de un paciente, o "genotipo de respuesta de fármaco"). Así, otro aspecto de la invención proporciona métodos para adaptar un tratamiento terapéutico o profiláctico del individuo con las moléculas de gen objetivo de la presente invención o los moduladores de gen objetivo de acuerdo con aquel genotipo de respuesta de fármaco del individuo. Los farmacogenómicos permiten a un médico o especialista objetivar los tratamientos terapéuticos o profilácticos a pacientes quienes se beneficiarán del tratamiento y evitarán el tratamiento de pacientes quienes experimentarán efectos colaterales tóxicos relacionados con el fármaco.

1. Métodos Profilácticos

Como se describe aquí, un agente terapéutico (por ejemplo, un agente ARNi o vector o transgen que codifica el mismo) se puede utilizar en un método para evitar en un sujeto, una enfermedad o afección asociada con una expresión o actividad de gen objetivo no esperada o aberrante, al administrar el agente terapéutico a un sujeto. Los sujetos en riesgo de una enfermedad que se origina o contribuye por la expresión o actividad de gen objetivo no esperada o aberrante se pueden identificar mediante, por ejemplo, cualquiera o una combinación de ensayos diagnósticos o pronósticos como se describe aquí. La administración de un agente profiláctico puede ocurrir antes de la manifestación de los síntomas característicos de la aberración del gen objetivo, de tal manera que una enfermedad o trastorno se evita o, alternativamente, se retrasa en su progresión. Dependiendo del tipo de aberración del gen objetivo, por ejemplo, un gen objetivo, agonista de gen objetivo o agente antagonista de gen objetivo se puede utilizar para tratar el sujeto. El agente apropiado se puede determinar con base los ensayos de detección descritos aquí.

2. Métodos Terapéuticos

También como se describe aquí, un agente terapéutico (por ejemplo, un agente ARNi o vector o transgen que codifica el mismo) que es específico para un gen objetivo o proteína (por ejemplo, es específico para el mARN codificado por dicho gen o específica la secuencia de aminoácido de dicha proteína) se puede utilizar en métodos para modular la expresión de gen objetivo, proteína expresión o actividad para propósitos terapéuticos. De acuerdo con lo anterior, en una realización de ejemplo, el método modulador en el que los agentes se pueden utilizar involucra poner en contacto una célula capaz de expresar el agente de gen objetivo de tal manera que expresión o una o más de las actividades de la proteína objetivo se modula. Estos métodos moduladores se pueden desarrollar in vitro (por ejemplo, al cultivar la célula con el agente) o, alternativamente, in vivo (por ejemplo, al administrar el agente a un sujeto). Como tal, la presente invención proporciona los agentes para uso en métodos para tratar un individuo afligido con una enfermedad o trastorno caracterizado por expresión o actividad no esperada o aberrante de un polipéptido de gen objetivo o molécula de ácido nucleico. La inhibición de la actividad de gen objetivo es

deseable en situaciones en las que el gen objetivo se sobrerregula anormalmente y/o en las que se reduce la actividad del gen objetivo por tener un efecto benéfico.

3. Farmacogenómicos

5 Los agentes terapéuticos (por ejemplo, un agente ARNi o vector o transgen que codifica el mismo) de la invención se puede administrar a los individuos para tratar (profilácticamente o terapéuticamente) trastornos asociados con actividad no esperada o aberrante del gen objetivo. En conjunto con tal tratamiento, se pueden considerar los farmacogenómicos (es decir, el estudio de la relación entre el genotipo de un individuo y aquella respuesta del individuo a un compuesto o fármaco extraño). Las diferencias en el metabolismo de los terapéuticos pueden conducir a severa toxicidad o falla terapéutica al alterar la relación entre la dosis y la concentración de sangre del fármaco farmacológicamente activo. Así, un médico o especialista puede considerar aplicar el conocimiento obtenido en los estudios farmacogenómicos relevantes para determinar si se administra un agente terapéutico así como también adapta la dosificación y/o régimen terapéutico del tratamiento con un agente terapéutico.

15 Los farmacogenómicos trata con variaciones hereditarias clínicamente significativas en respuesta a los fármacos debido a la disposición de fármaco alterada y acción anormal en las personas afectadas. Ver, por ejemplo, Eichelbaum, M. et al. (1996) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23(10-11): 983-985 y Linder, M.W. et al. (1997) Clin. Chem. 43(2):254-266. En general, dos tipos de condiciones farmacogenéticas se pueden diferenciar. Las condiciones genéticas transmitidas como un único factor alteran la forma en que actúan los fármacos en el cuerpo (acción de fármaco alterada) o las condiciones genéticas transmitidas como factores únicos que alteran la forma en la actúa el cuerpo sobre el fármaco (metabolismo del fármaco alterado). Estas condiciones farmacogenéticas pueden ocurrir como defectos genéticos raros o como polimorfismos de ocurrencia natural. Por ejemplo, la deficiencia de deshidrogenasa glucosa-6-fosfato (G6PD) es una enzimopatía inherente común en la que la complicación clínica principal es hemólisis después de la ingesta de fármacos oxidantes (anti-malariales, sulfonamidas, analgésicos, nitrofuranos) y el consumo de habas.

25 Un método farmacogenómico para identificar los genes que predicen la respuesta de fármaco, conocido como "una asociación amplia a genoma", se basa principalmente en un mapa de alta resolución del genoma humano que consiste de marcadores relacionados con el gen ya conocidos (por ejemplo, un mapa marcador de gen "bi-alélico" que consiste de 60,000-100,000 sitios variables o polimórficos dentro del genoma humano, cada uno de los cuales tiene dos variantes). Tal un mapa genético de alta resolución se puede comparar con el mapa del genoma de cada número estadísticamente significativo de pacientes que toman parte en el ensayo de fármaco Fase II/III para identificar los marcadores asociados con una respuesta al fármaco observada particular o efecto colateral. Alternativamente, tal un mapa de alta resolución se puede generar de una combinación de algunos diez millones de polimorfismos de nucleótido únicos conocidos (SNP) en el genoma humano. Como se utiliza aquí, un "SNP" es una alteración común que ocurre en una única base de nucleótido en un tramo de ADN. Por ejemplo, un SNP puede ocurrir una vez por cada 1000 bases de ADN. Un SNP se puede involucrar en un proceso de enfermedad, sin embargo, la vasta mayoría no se puede asociar con la enfermedad. Dado un mapa genético con base la ocurrencia de tales SNP, los individuos se puede agrupar en categorías genéticas dependiendo de un patrón particular de SNP en su genoma individual. En tal una forma, los regímenes de tratamiento se puede adaptar en los grupos de individuos genéticamente similares, tomando en cuenta rasgos que son comunes entre tales individuos genéticamente similares.

40 Alternativamente, un método denominado el "método de gen candidato", se puede utilizar para identificar genes que predicen la respuesta del fármaco. De acuerdo con este método, si se conoce un gen que codifica un fármaco objetivo (por ejemplo, un polipéptido de gen objetivo de la presente invención), todas las variantes comunes de aquel gen se pueden identificar fácilmente en la población y esto se puede determinar si tiene una versión del gen versus otra versión del gen que se asocia con una respuesta del fármaco particular.

45 Como una realización ilustrativa, la actividad de las enzimas que metabolizan el fármaco es un determinante principal de la intensidad y duración de la acción del fármaco. El descubrimiento de los polimorfismos genéticos de las enzimas que metabolizan el fármaco (por ejemplo, enzimas N-acetiltransferasa 2 (NAT 2) y citocromo P450 CYP2D6 y CYP2C19) ha proporcionado una explicación de porqué algunos pacientes no obtienen los efectos de fármaco esperados o muestran exagerada respuesta al fármaco y sería toxicidad después de tomar la dosis segura y estándar de un fármaco. Estos polimorfismos se expresan en dos fenotipos en la población, el metabolizador extensivo (EM) y metabolizador pobre (PM). La prevalencia del PM es diferente entre diferentes poblaciones. Por ejemplo, la codificación del gen para CYP2D6 es altamente polimórfica y se han identificado varias mutaciones en PM, que conducen a la ausencia de CYP2D6 funcional. Los metabolizadores pobres de CYP2D6 y CYP2C19 experimentan más frecuentemente respuesta al fármaco exagerada y efectos colaterales cuando ellos reciben dosis estándar. Si un metabolito es el grupo funcional terapéutico activo, el PM no muestra respuesta terapéutica, como se demuestra para el efecto analgésico de la codeína mediada por morfina de metabolito formada por CYP2D6. El otro extremo son los así denominados metabolizadores ultrarrápidos quienes no responden a dosis estándar. Recientemente, se ha identificado la base molecular del metabolismo ultrarrápido debido a que es la amplificación del gen CYP2D6.

Alternativamente, un método denominado el "perfil de expresión de gen", se puede utilizar para identificar genes que predicen la respuesta del fármaco. Por ejemplo, la expresión de gen de un animal dosificado con un agente terapéutico de la presente invención puede dar una indicación de si las rutas del gen se relacionan con la toxicidad se han encendido.

- 5 La información generada de más de uno de los métodos farmacogenómicos anteriores se puede utilizar para determinar la dosificación apropiada y los regímenes de tratamiento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de un individuo. Este conocimiento, cuando se aplica a la dosificación o selección del fármaco, puede evitar reacciones adversas o falla terapéutica y así mejorar la eficiencia terapéutica o profiláctica cuando se trata un sujeto con un agente terapéutico, como se describe aquí.
- 10 Se pueden probar agentes terapéuticos en un modelo de animal apropiado. Por ejemplo, un agente ARNi (o vector de expresión o transgen que codifica el mismo) como se describe aquí se puede utilizar en un modelo de animal para determinar la eficacia, toxicidad, o efectos colaterales del tratamiento con dicho agente. Alternativamente, un agente terapéutico se puede utilizar en un modelo de animal para determinar el mecanismo de acción de tal un agente. Por ejemplo, un agente se puede utilizar en un modelo de animal para determinar la eficacia, toxicidad, o efectos colaterales del tratamiento con tal un agente. Alternativamente, un agente se puede utilizar en un modelo de animal para determinar el mecanismo de acción de tal un agente.
- 15

V. Composiciones Farmacéuticas

- La invención pertenece a usos de los agentes descritos anteriormente para tratamientos terapéuticos como se describe infra. De acuerdo con lo anterior, los moduladores de la presente invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Tales composiciones típicamente comprenden la molécula de ácido nucleico, proteína, anticuerpo, o compuesto modulador y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza aquí el lenguaje "portador farmacéuticamente aceptable" está destinado a incluir cualquier y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes que retrasan la absorción e isotónicos, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tal medio y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en el caso de medios o agentes convencionales son incompatibles con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. Los compuestos activos complementarios también se pueden incorporar en las composiciones.
- 20
- 25

- Una composición farmacéutica de la invención se formula por ser compatible con su ruta destinada de administración. Ejemplos de rutas de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), y transmucosal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir incluyen los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tal como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tal como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tal como ácido tilenodiaminatetraacético; amortiguadores tal como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tal como cloruro de sodio o dextrosa. Se puede ajustar el pH con ácidos o bases, tal como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o frascos de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.
- 30
- 35

- Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (en donde son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina amortiguada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición puede ser estéril y debe ser fluida al grado que existe fácil capacidad de inyección. Esta puede ser estable bajo condiciones de fabricación y almacenamiento y se puede preservar contra la acción contaminante de microorganismos tal como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y sus mezclas adecuadas. La fluidez propia se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tal como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede estar cerca al incluir en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- 40
- 45
- 50

- Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar al incorpora el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con una o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorpora el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de
- 55

aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de las soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado por vacío y secado por congelamiento que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada del mismo.

- 5 Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Ellas se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o comprimir en tabletas. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y se puede utilizar en la forma de comprimidos, grageas, o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar utilizando un portador fluido para uso como un enjuague bucal, en donde el compuesto en el portador fluido se aplica oralmente y se agita y expectora o traga. Los
- 10 agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, grageas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un ligador tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un aglutinante tal como dióxido de sílice
- 15 coloidal; un agente endulzante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, metil salicilato, o sabor naranja.

Para la administración mediante inhalación, los compuestos se suministran en la forma de un rociado por aerosol de un contenedor o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

- 20 La administración sistémica también puede ser por medio transmucosal o transdérmico. Para la administración transmucosal o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a ser permeabilizada se utilizan. Tales penetrantes se conocen generalmente en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede llevar a cabo a través del uso de rociadores nasales o supositorios. Para la administración
- 25 transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, salvias, geles, o cremas como se conoce de manera general en la técnica.

Los compuestos también se pueden preparar en la forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencional tal como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para el suministro rectal.

- 30 En una realización, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulado. Los polímeros biodegradables, biocompatibles se pueden utilizar, tal como acetato de vinilo etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para aquellos expertos en la técnica. Los materiales n también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions
- 35 (incluyendo liposomas objetivadas para infectar células con anticuerpos monoclonales para antígenos víricos) también se pueden utilizar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente Estadounidense No. 4,522,811.

- 40 Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria para cada caso de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria como se utiliza aquí se refiere a unidades físicamente discretas como dosificaciones unitarias para el sujeto a ser tratado; cada unidad que contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención se dicta mediante y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto
- 45 terapéutico particular a ser alcanzado, y las limitaciones inherentes en la técnica de compuesto de tal un compuesto activo para el tratamiento de individuos.

- La toxicidad y eficacia terapéutica de tales compuestos se puede determinar mediante procedimiento farmacéutico estándar en los cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar el LD50 (la dosis letal a 50% de la población) y el ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos y es el índice terapéutico y este se puede expresar como la relación de LD50/ED50. Se prefieren los compuestos que exhiben grandes índices terapéuticos. Aunque se puede utilizar los compuestos que exhiben efectos colaterales tóxicos, se debe tener cuidado en diseñar un sistema de suministro que objetiva tales compuestos en el sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos colaterales.
- 50

- 55 Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios de animal se pueden utilizar en formular un rango de dosificación para uso en humanos. La dosificación de tales compuestos cae preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen el ED50 con poca o sin toxicidad. La dosificación puede variar dentro de

este rango dependiente de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimular inicialmente de los ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos de animal para alcanzar un rango de concentración de plasma circulante que incluye el EC50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que alcanza una respuesta media máxima) como se determina en el cultivo celular. Tal información se puede utilizar para determinar más exactamente las dosis útiles en los humanos. Se pueden medir los niveles en el plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto desempeño.

Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un contenedor, empaque, o dispensador junto con instrucciones para administración.

10 VI. Organismos o Células Knockout y/o Knockdown

Un uso preferido adicional para los agentes ARNi de la presente invención (o vectores o transgenes que codifican el mismo) es un análisis funcional que se lleva a cabo en células eucarióticas, o organismos no humanos eucarióticos, preferiblemente células de mamífero u organismos y más preferiblemente células humanas, por ejemplo estirpes celulares tal como HeLa o 293 o roedores, por ejemplo ratas y ratones. Al administrar un agente ARNi adecuado que es que es suficientemente complementario con una secuencia de mRNA objetivo para dirigir la interferencia de ARN específica objetivo, un fenotipo específico knockout o knockdown se puede obtener en una célula objetivo, por ejemplo en cultivo celular o en un organismo objetivo.

Así, una materia objeto adicional de la invención es una célula eucariótica o un organismo no humano eucariótico que exhibe un fenotipo knockout o knockdown específico del gen objetivo que comprende una expresión completa o por lo menos parcialmente deficiente de por lo menos un gen objetivo endógeno en donde dicha célula u organismo se transfecta con por lo menos un vector que comprende ADN que codifica un agente ARNi capaz de inhibir la expresión del gen objetivo. Se debe notar que la presente invención permite un knockout o knockdown específico objetivo de varios diferentes genes endógenos debido a la especificidad del agente ARNi.

Los fenotipos knockout o knockdown específicos de gen de células o organismos no humanos, particularmente de células de mamíferos humanos o no humanos se puede utilizar en procedimientos analíticos, por ejemplo en el análisis funcional y/o fenotípico de los procesos fisiológicos de complejo tal como análisis de perfiles de expresión de gen y/o proteomas. Preferiblemente el análisis se lleva a cabo mediante métodos de alto rendimiento utilizando oligonucleótido con base en chips.

Utilizando tecnologías knockout o knockdown con base en ARNi, la expresión de un gen objetivo endógeno se puede iniciar en una célula objetivo u organismo objetivo. El gen endógeno se puede complementar mediante un ácido nucleico objetivo exógeno que codifica la proteína objetivo o una variante o forma mutada de las proteína objetivo, por ejemplo un gen o un ADN, que se puede fusionar opcionalmente en una secuencia de ácido nucleico adicional que codifica un péptido o polipéptido detectable, por ejemplo una etiqueta de afinidad, particularmente una etiqueta de múltiple afinidad.

Las variantes o formas mutadas del gen objetivo difieren del gen objetivo endógeno en que ellas codifican un producto de gen que difiere del producto de gen endógeno en el nivel de aminoácido mediante sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de únicos o múltiples aminoácidos. Las variantes o formas mutadas pueden tener la misma actividad biológica como el gen objetivo endógeno. Por otra parte, la variante o gen objetivo mutado también puede tener una actividad biológica, que difiere de la actividad biológica del gen objetivo endógeno, por ejemplo una actividad parcialmente eliminada, una actividad completamente eliminada, una actividad mejorada etc. La complementación se puede llevar a cabo al comprimir el polipéptido codificado por el ácido nucleico endógeno, por ejemplo una proteína de fusión que comprende la proteína objetivo y la etiqueta de afinidad y la molécula de ARN bicatenaria para desactivar el gen endógeno en la célula objetivo. Esta compresión se puede llevar a cabo al utilizar un vector de expresión adecuado que expresa el polipéptido codificado por el ácido nucleico endógeno, por ejemplo la proteína objetivo modificada por la etiqueta y la molécula de ARN bicatenaria o alternativamente al utilizar una combinación de vectores de expresión. Las proteínas y complejos de proteína que se sintetizan de nuevo en la célula objetivo contendrán el producto de gen exógeno, por ejemplo, la proteína de fusión modificada. Con el fin de evitar la supresión del producto de gen exógeno mediante el agente ARNi, la secuencia de nucleótido que codifica el ácido nucleico exógeno se puede alterar en el nivel de ADN (con o sin originar mutaciones en el nivel de aminoácido) en la parte de la secuencia que es homóloga al agente ARNi. Alternativamente, el gen objetivo endógeno se puede complementar mediante las secuencias de nucleótido correspondientes de otras especies, por ejemplo de ratón.

VII. Organismos Transgénicos

Los precursores de ARN construidos por ingeniería de la invención se pueden expresar en animales transgénicos. Estos animales representan un sistema de modelo para el estudio de trastornos que se originan por, o se exacerban

por, la sobreexpresión o bajo expresión (cuando se compara con tipo natural o normal) de ácidos nucleicos (y sus polipéptidos codificados) objetivados para la destrucción mediante los agentes ARNi, por ejemplo, siARN y shARN, y para el desarrollo de los agentes terapéuticos que modulan la expresión o actividad de los ácidos nucleicos o polipéptidos objetivados para destrucción.

- 5 Los animales transgénicos pueden ser animales de granja (cerdos, cabras, ovejas, vacas, caballos, conejos, y similares), roedores (tal como ratas, conejillos de indias, y ratones), primates no humanos (por ejemplo, babuinos, monos, y chimpancés), y animales domésticos (por ejemplo, perros y gatos). Se pueden utilizar invertebrados tal como *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila* así como también vertebrados no mamíferos tal como peces (por ejemplo, pez cebra) o aves (por ejemplo, pollos).
- 10 Los precursores de ARN construidos por ingeniería con corrientes de 18 a 30 nucleótidos en longitud se prefieren para uso en mamíferos, tal como ratones. Un animal fundador transgénico se puede identificar con base en la presencia de un transgen que codifica los nuevos precursores de ADN en su genoma, y/o la expresión del transgen en tejidos o células de los animales, por ejemplo, utilizando PCR o análisis Northern. Se confirma la expresión mediante una reducción en la expresión (ARN o proteína) de la secuencia objetivo.
- 15 Un animal fundador transgénico se puede utilizar para criar animales adicionales que llevan el transgen. Más aún, los animales transgénicos llevan un transgen que codifica los precursores de ARN pueden además ser criados en otros animales transgénicos que llevan otros transgenes. Adicionalmente, las células obtenidas del animal fundador transgénico o su descendencia se puede cultivar para establecer estirpes celulares primarias, secundarias, o inmortales que contienen el transgen.

20 1. Procedimientos para Elaborar Animales No Humanos, Transgénicos

- Un número de métodos se ha utilizado para obtener animales no humano, transgénicos, que son animales que han ganado un gen adicional mediante la introducción de un transgen en sus células (por ejemplo, células de gen y somáticas), o en una estirpe de gen antecesora. En algunos casos, los animales transgénicos se puede generar mediante facilidades comerciales (por ejemplo, The Transgenic *Drosophila* Facility at Michigan State University, The Transgenic Zebrafish Core Facility at the Medical College of Georgia (Augusta, Georgia), y Xenogen Biosciences (St. Louis, MO). En general, se suministra a la instalación la construcción que contiene el transgen para generar un animal transgénico.
- 25

- Los métodos para generar animales transgénicos incluyen introducir el transgen en la línea germinal del animal. Un método es mediante microinyección de una construcción de gen en el pronúcleo de un embrión de etapa temprana (por ejemplo, antes de la etapa fourcell; Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5016; Brinster et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438). Alternativamente, el transgen se puede introducir en el pronúcleo mediante infección retroviral. Se ha descrito un procedimiento detallado para producir tales ratones transgénicos (see por ejemplo, Hogan et al., MP1 ulating the Mouse ErnbnLo. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY (1986); Patente Estadounidense No. 5,175,383 (1992)). Este procedimiento también se ha adaptado para otras especies animales (por ejemplo, Hammer et al., 1985, Nature 315:680; Murray et al., 1989, Reprod. Fert. Devl. 1:147; Pursel et al., 1987, Vet. Immunol. Histopath. 17:303; Rexroad et al., 1990, J. Reprod. Fert. 41 (suppl): 1 19; Rexroad et al., 1989, Molec. Reprod. Devl. 1:164; Simons et al., 1988, BioTechnology 6:179; Vize et al., 1988, J. Cell. Sci. 90:295; y Wagner, 1989, J. Cell. Biochem. 13B (suppl): 164).
- 30
- 35

- En resumen, el procedimiento involucra introducir el transgen en un animal al microinyectar la construcción en el pronúcleo de los huevos de mamífero fertilizados para originar una o más copias del transgen que se retienen en las células del mamífero desarrollado. Luego de introducción de la construcción de transgen dentro del huevo fertilizado, el huevo se puede incubar in vitro para variar cantidades de tiempo, o reimplantar a un anfitrión subrogado, o ambos. Un método común es para incubar los embriones in vitro durante aproximadamente 1-7 días, dependiendo de las especies, y luego reimplantarlos en el anfitrión subrogado. La presencia del transgen en el progenie de los embriones manipulados transgénicamente se puede probar mediante análisis Southern blot de un segmento de tejido.
- 40
- 45

- Otro método para producir animales transgénicos de línea germinal es a través del uso células madre embrionarias (ES). La construcción de gen se puede introducir dentro de células madre embrionarias mediante recombinación homóloga (Thomas et al., 1987, Cell 51:503; Capecchi, Science 1989, 244:1288; Joyner et al., 1989, Nature 338:153) en una región transcripcionalmente activa del genoma. Una construcción adecuada también se puede introducir dentro de células madre embrionarias mediante transfección mediada por ADN, tal como mediante electroporación (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987). Los procedimientos detallados para cultivar células madre embrionarias (por ejemplo, ES-D3@ ATCC# CCL-1934, ES-E14TG2a, ATCC# CCL-1821, American Type Culture Collection, Rockville, AM) y métodos para elaborar animales transgénicos de células madre embrionarias se puede encontrar en Teratocarcinomas y Células madre embrionarias, A Practical Approach, ed. E.J. Robertson (IRL Press, 1987). En resumen, las células ES se obtienen de embriones de preimplantación cultivados in vitro (Evans et al., 1981, Nature 292: 154-156). Se pueden introducir eficientemente
- 50
- 55

transgenes dentro de células ES mediante transfección de ADN o mediante transducción mediada por retrovirus. Las células ES transformadas resultantes por lo tanto se pueden combinar con blastocistos de un animal no humano. Las células ES que colonizan el embrión y contribuyen a la línea germinal del animal quimérico resultante.

5 En los métodos anteriores, el transgen se puede introducir como una construcción lineal, un plásmido circular, o un vector vírico, que se puede incorporar y heredar como un transgen integrado en el genoma anfitrión. El transgen también se puede construir para permitir a ser heredado como un plásmido extracromosomal (Gassmann et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1292). Un plásmido es una molécula de ADN que se puede replicar automáticamente en un anfitrión.

10 Los animales no humanos, transgénicos también se pueden obtener al infectar o transfectar células in vivo (por ejemplo, inyección directa), ex vivo (por ejemplo, infectar células fuera del anfitrión y después reimplantarlas), o in vitro (por ejemplo, infectar células fuera del anfitrión), por ejemplo, con un vector vírico recombinante que lleva un gen que codifica los precursores de ARN construidos por ingeniería. Ejemplos de vectores víricos adecuados incluyen vectores retrovíricos recombinantes (Valerio et al., 1989, Gene 84:419; Scharfinan et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:462; Miller y Buttimore, 1986, Mol. Cell. Biol. 6:2895), vectores adenovíricos recombinantes (Freidman et al., 1986, Mol. Cell. Biol. 6:3791; Levrero et al., 1991, Gene 101: 195), y vectores víricos Herpes simples recombinante (Fink et al., 1992, Human Gene Therapy 3:11). Tales métodos también son útiles para introducir construcciones dentro de las células para usos diferentes a la generación de animales transgénicos.

20 Otros métodos incluyen inserción de transgenes que codifican los nuevos precursores de ARN construidos por ingeniería dentro de vectores víricos incluyendo adenovirus recombinante, virus asociado adeno, y virus 1 de herpes simplex, o plásmidos bacterianos recombinantes o plásmidos eucarióticos. Los vectores víricos transfectan las células directamente. Otros métodos incluyen suministrar los transgenes, en la forma de ADN de plásmido, con la ayuda de, por ejemplo, liposomas catiónicos (lipofectina) o derivados (por ejemplo anticuerpo conjugado) conjugados polilisina, gramacidina S, envolturas víricas artificiales, u otros tales portadores intracelulares, así como también inyección directa de la construcción de transgen o precipitación CaPO₄ llevada a cabo in vivo. Tales métodos también se pueden utilizar in vitro para introducir las construcciones dentro de las células para usos diferentes a la generación de animales transgénicos.

30 Los vectores de retrovirus y vectores de adenovirus asociados se pueden utilizar como un sistema de suministro hecho recombinantes para la transferencia de genes exógenos in vivo o in vitro. Estos vectores proporcionan suministro eficiente de genes dentro de las células, y los ácidos nucleicos transferidos se integran establemente dentro del ADN cromosómico del anfitrión. El desarrollo de estirpes celulares especializadas (denominado "células de empaque") que produce solo retrovirus defectuosos de replicación ha incrementado la utilidad de los retrovirus para la terapia de gen, y los retrovirus defectuosos se caracterizan para uso en transferencia de gen para propósitos de terapia de gen (para una revisión ver Miller, 1990, Blood 76:271). Un retrovirus defectuoso de replicación se puede empaquetar dentro de viriones que se pueden utilizar para infectar una célula objetivo a través del uso de virus auxiliares mediante técnicas estándar. Los protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células in vitro o in vivo con tales virus se puede encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M. et al., (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Secciones 9.9.14 y otros manuales de laboratorio estándar.

40 Ejemplos de retrovirus adecuados incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM que se conocen por aquellos expertos en la técnica. Ejemplos de líneas de virus de empaque adecuados para preparar los sistemas retrovíricos ecotrópicos y amfotrópicos incluyen Psi-Crip, PsiCre, Psi-2 y Psi-Am. Los retrovirus se han utilizado para introducir una variedad de genes en muchos tipos de células diferentes, incluyendo células epiteliales, in vitro y/o in vivo (ver por ejemplo Eglitis, et al., 1985, Science 230:1395-1398; Danos y Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464; Wilson et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018; Armentano et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:61416145; Huber et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury et al., 1991, Science 254:1802-1805; van Beusechem. et al., 1992, Proc. Nad. Acad. Sci. USA 89:7640-19 ; Kay et al., 1992, Human Gene Therapy 3:641-647; Dai et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu et al., 1993, J. Immunol. 150: 4104-4115; la Patente Estadounidense No. 4,868,116; la Patente Estadounidense No. 4,980,286; Solicitud PCT WO 89/07136; Solicitud PCT WO 89/02468; Solicitud PCT WO 89/05345; y Solicitud PCT WO 92/07573).

50 En otro ejemplo, los vectores retrovíricos recombinantes capaces de traducir y expresar los genes insertados en el genoma de una célula se puede producir al transfectar el genoma retrovírico recombinante en estirpes celulares de empaque adecuadas tal como PA317 y Psi-CRIP (Comette et al., 1991, Human Gene Therapy 2:5-10; Cone et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6349). Los vectores adenovíricos recombinantes se pueden utilizar para infectar una amplia variedad de células y tejidos en anfitriones susceptibles (por ejemplo, rata, hámster, perro, y chimpancé) (Hsu et al., 1992, J. Infectious Disease, 166:769), y también tienen la ventaja de no requerir células mitóticamente activas para infección. Otro sistema de suministro de gen vírico útil en la presente invención también utiliza vectores derivados de adenovirus. El genoma de un adenovirus se puede manipular de tal manera que este codifica y expresa un producto de gen de interés pero se inactiva en términos de su capacidad para replicar en un ciclo de vida vírico lítico normal. Ver, por ejemplo, Berkner et al. (1988, BioTechniques 6:616), Rosenfeld et al. (1991, Science

252: 431-434), y Rosenfeld et al. (1992, Cell 68:143-155). Los vectores adenovíricos derivados de la hebra adenovirus tipo Ad 5 d1324 u otras hebras de adenovirus (por ejemplo, Ad2, AO, Ad7 etc.) se conocen por aquellos expertos en la técnica. Los adenovirus recombinantes pueden ser ventajosos en ciertas circunstancias en que ellos no son capaces de infectar células no divididas y se pueden utilizar para infectar una amplia variedad de tipos de células, incluyendo células epiteliales (Rosenfeld et al., 1992, citado supra). Adicionalmente, la partícula de virus es relativamente estable y susceptible de purificación y concentración, y como anteriormente, se puede modificar para afectar el espectro de ineffectividad. Adicionalmente, el ADN adenovírico introducido (y el ADN extraño contenido allí) no se integra dentro del genoma de una célula anfitriona pero permanece episómico, evitando por lo tanto problemas potenciales que pueden ocurrir como un resultado de mutagenia insercional in situ en donde se introduce ADN que se llega a integrar en el genoma anfitrión (por ejemplo, ADN retrovírico). Más aún, la capacidad llevada del genoma adenovírico para el ADN extraño es largo (hasta 8 kilobases) con relación a otros vectores de suministro de gen (Berkner et al. cited supra; Haj-Ahmand y Graham, 1986, J. Virol. 57:267).

Todavía otro sistema de vector vírico útil para el suministro de los transgenes del sujeto es el virus asociado adeno (AAV). El virus asociado adeno es un virus defectuoso de ocurrencia natural que requiere otro virus, tal como un adenovirus o un virus herpes, como un virus auxiliar para replicación eficiente y un ciclo de vida productivo. Para una revisión, ver Muzyczka et al. (1992, Curr. Topics in Micro. and Immunol. 158:97-129). También uno de los pocos virus que pueden integrar su ADN en células no divididas, y que exhibe una alta frecuencia de integración estable (ver por ejemplo Flotte et al. (1992, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7:349-356; Samulski et al., 1989, J. Virol. 63:3822-3828; y McLaughlin et al. (1989, J. Virol. 62: 1963-1973). Los vectores que contienen tan poco como 300 pares base de AAV se pueden empacar y se pueden integrar. El espacio para el ADN exógeno se limita a aproximadamente 4.5 kb. Un vector AAV tal como aquel descrito en Tratschin et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 se puede utilizar para introducir en ADN dentro de las células. Una variedad de ácidos nucleicos se han introducido en diferentes tipos de células utilizando los vectores AAV (ver por ejemplo Hennonat et al. (1984) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81:6466-6470; Tratschin et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081; Wondisford et al. (1988) Mol. Endocrinol. 2:32-39; Tratschin et al. (1984) J. Virol. 51:611-619; y Flotte et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:3781-3790).

Adicionalmente a los métodos de transferencia vírica, tal como aquellos ilustrados anteriormente, también se pueden emplear métodos no víricos que originan la expresión de un shARN o precursor de ARN construido por ingeniería de la invención en el tejido de un animal. La mayoría de métodos no víricos de transferencia de gen se basa en mecanismos noanales utilizados mediante células de mamífero para la retoma y transporte intracelular de macromoléculas. En realizaciones preferidas, los sistemas de suministro de gen no vírico de la presente invención se basa en rutas endocíticas para la retoma del gen del sujeto de la invención mediante la célula objetivo. Los sistemas de suministro de gen de ejemplo de este tipo incluyen sistemas derivados de liposomas, conjugados poli-lisina, y envolturas víricas artificiales. Otras realizaciones incluyen sistemas de inyección de plásmido tal como se describen en Meuli et al., (2001) J. Invest. Dermatol., 116 (1):131-135; Cohen et al., (2000) Gene Ther., 7(22):1896-905; y Tam et al., (2000) Gene Ther., 7(21):186774.

En una realización representativa, un gen que codifica un shARN o precursor de ARN construido por ingeniería de la invención se pueden atrapar en liposomas que llevan cargas positivas en su superficie (por ejemplo, lipofectinas) y (opcionalmente) que se etiquetan con anticuerpos contra los antígenos de superficie celular del tejido objetivo (Mizuno et al., (1992) No Shinkei Geka, 20: 547-55 1; publicación PCT WO91/06309; solicitud de patente Japonesa 10473 8 1; y publicación de patente Europea EPA- 43 075).

Los animales que albergan el transgen que se puede identificar al detectar la presencia del transgen en el ADN genómico (por ejemplo, utilizando análisis Southern). Adicionalmente, la expresión del shARN o precursor de ARN construido por ingeniería se puede detectar directamente (por ejemplo, mediante análisis Northern). La expresión del transgen también se puede confirmar al detectar una reducción en la cantidad de proteína que corresponde a la secuencia objetivo. Cuando el transgen está bajo el control de un promotor inducible o desarrolladamente regulado, la expresión de la proteína objetivo se reduce cuando el transgen se induce o en la etapa desarrollada cuando se expresa el transgen, respectivamente.

2. Clones de Animales Transgénicos

Los clones de los animales transgénicos no humanos descritos aquí se pueden producir de acuerdo con los métodos descritos en Wilmut et al. ((1997) Nature, 385:810-813) y publicación PCT Nos. WO 97/07668 y WO 97/07669. En resumen, una célula, por ejemplo, una célula somática del animal transgénico, se puede aislar e inducir para salir en el ciclo de crecimiento e ingresar en la fase G0 para llegar a estar en reposo. La célula quiescente luego se puede fusionar, por ejemplo, a través del uso de pulsos eléctricos, en un oocito enucleado de un animal de la misma especie de la cual se aísla la célula quiescente. El oocito reconstruido luego se cultiva de tal manera que este se desarrolla en una mórula o blastocito y luego se transfiere a un animal de crianza hembra pseudopreñado. La descendencia nacida de este animal de crianza hembra serán clones del animal del cual se aísla la célula, por ejemplo, la célula somática.

Una vez se produce el animal transgénico, las células del animal transgénico y las células de un animal de control se detectan para determinar la presencia de una secuencia de ácido nucleico de precursor ARN, por ejemplo, utilizando reacción de cadena polimerasa (PCR). Alternativamente, las células se pueden detectar para determinar si se expresa el precursor de ARN (por ejemplo, mediante procedimientos estándar tal como análisis Northern o reacción de cadena transcriptasa-polimerasa inversa (RT-PCR); Sambrook et al., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)).

Los animales transgénicos de la presente invención pueden ser homocigotos o heterocigotos, y uno de los beneficios de la invención es que el mRNA objetivo se degrada efectivamente aún en heterocigotos. La presente invención se proporciona para animales transgénicos que llevan un transgen de la invención en todas sus células, así como también animales que llevan un transgen en algunas, pero no en todas sus células. Esto es, la invención se proporciona para animales mosaicos. El transgen se puede integrar como un transgen único o en concatenadores, por ejemplo, tándem cabeza a cola o cola a cabeza.

Para una revisión de las técnicas que se pueden utilizar para generar y evaluar los animales transgénicos, los artesanos expertos pueden consultar a Gordon (*lwl Rev. Cytol* 1 1 5:171-229, 1989), y pueden obtener guía adicional de, por ejemplo: Hogan et al. "Manipulating the Mouse Embryo" (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1986; Krimpenfort et al., *BioTechnology* 9:86, 1991; Palmiter et al., *Cell* 41:343, 1985; Kraemer et al., "Genetic Manipulation of the Early Mammalian Embryo," Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1985; Hammer et al., *Nature* 315:680, 1985; Purcell et al., *Science*, 244:1281, 1986; Wagner et al., la Patente Estadounidense No. 5,175,385; y Krimpenfort et al., la Patente Estadounidense No. 5,175,384.

3. Plantas Transgénicas

Entre los organismos eucarióticos caracterizados en la invención son plantas que contienen un ácido nucleico exógeno que codifica un precursor de ARN construido por ingeniería de la invención.

De acuerdo con lo anterior, un método de acuerdo con la invención comprende elaborar una planta que tiene una molécula de ácido nucleico o construcción, por ejemplo, un transgen, descrito aquí. Las técnicas para introducir ácidos nucleicos exógenos en plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas se conocen en la técnica, e incluyen, sin limitación, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por vector vírico, electroporación y transformación por pistola de partículas, ver, por ejemplo, la Patente Estadounidenses Nos. 5,204,253 y 6,013,863. Si se utiliza una célula o cultivo de tejido como el tejido receptor para transformación, las plantas se pueden regenerar de cultivos transformados mediante las técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica. Las plantas transgénicas se pueden ingresar en un programa de siembra, por ejemplo, para introducir un ácido nucleico que codifica un polipéptido dentro de otras estirpes, para transferir el ácido nucleico a otras especies o para selección adicional de otros rasgos deseables. Alternativamente, las plantas transgénicas se pueden propagar vegetativamente mediante aquellas especies susceptibles de tales técnicas. La progenie incluye descendientes de una planta particular o estirpe de planta. La progenie de una planta incluye semillas formadas en F1, F2, F3, y plantas de generación posterior, o semillas formadas en BQ, BC2, BC3, y plantas de generación posterior. Las semillas producidas por una planta transgénica se pueden hacer crecer y luego autofecundadas (o cruzadas y autofecundadas) para obtener semillas homocigotas del ácido nucleico que codifica un polipéptido novedoso.

Un grupo adecuado de plantas con las que se practica la invención incluyen dicotiledóneas, tal como coliflor, alfalfa, soya, colza (ácido erúxico alto y canola), o girasol. También son adecuadas las monocotiledóneas tal como maíz, trigo, centeno, cebada, avena, arroz, mijo, amaranto o sorgo. También son adecuados los cultivos vegetales o cultivos de raíz tal como papa, brócoli, guisantes, maíz dulce, maíz, tomate, habichuelas (incluyendo frijol, habichuelas de lima, habichuelas secas, habichuelas verdes) y similares. También son adecuados los cultivos de frutas tal como melocotón, pera, manzana, fresa, naranja, limón, uvas, ciruela, mango y palma. Así, la invención tiene uso sobre un amplio rango de plantas, que incluyen especies del género *Anacardium*, *Arachis*, *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Brassica*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Carthamus*, *Cocos*, *Coffea*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Daucus*, *Elaeis*, *Fragaria*, *Glycine*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hordeum*, *Hyoscyalinus*, *Lactuca*, *Linum*, *Lolium*, *Lupinus*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot*, *Majorana*, *Medicago*, *Nicotiana*, *Olea*, *Oryza*, *Panicum*, *Pannisetum*, *Persea*, *Phaseolus*, *Pistachia*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Raphanus*, *Ricinus*, *Secale*, *Senecio*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sorghum*, *Theobromus*, *Trigonella*, *Triticum*, *Vicia*, *Vitis*, *Vigna* y *Zea*.

El experto en la materia apreciará que los organismos enumerados también son útiles para practicar otros aspectos de la invención, por ejemplo, como células anfitrionas, como se descubrió anteriormente.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden expresar en plantas en una forma específica de célula o tejido de acuerdo con los elementos reguladores seleccionados que se incluyen en una construcción de ácido nucleico particular presente en la planta. Las células, tejidos y órganos adecuados en los que se expresa un polipéptido quimérico de la invención incluyen, sin limitación, óvulo, célula central, célula synergid, cigoto, óvulo primordio, nucela, tegumentos, endotelio, células gametofito femeninas, embrión, eje, cotiledones, suspensor, endospermo, cubierta de semilla, meristema de suelo, tejido vascular, cámbium, floema, corteza, brotes laterales o

meristemas de raíz, meristemas apicales de brote o raíz, meristemo floral, primordios de hojas, células del mesófilo de la hoja y hojas de células de la epidermis, por ejemplo, células epidérmicas que participan en formación de la capa cuticular. También son adecuadas las células y tejidos que crecen en medio líquido o en medio semisólido.

4. Hongos Transgénicos

5 Otros organismos eucarióticos caracterizados en la invención son hongos que contienen una molécula exógena de ácido nucleico que codifica un precursor de ARN construido por ingeniería de la invención. De acuerdo con lo anterior, un método de acuerdo con la invención comprende introducir una molécula de ácido nucleico o construcción como se describe aquí dentro de un hongo. Las técnicas para introducir ácidos nucleicos exógenos dentro de muchos hongos se conocen en la técnica, ver, por ejemplo, la Patente Estadounidenses Nos. 5,252,726 y 10 5,070,020. Se pueden cultivar hongos transformados mediante técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica. Tales hongos se pueden utilizar para introducir un ácido nucleico que codifica un polipéptido dentro de otras hebras de hongo, para transferencia del ácido nucleico en otras especies o para la selección adicional de otros rasgos deseables.

15 Un grupo adecuado de hongos con los cuales se practica la invención incluyen levadura fisión y levadura en ciernes, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe*, *S. carlsbergensis* y *Candida albicans*. Los hongos filamentosos tal como *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. también son útiles.

VIII. Genómicos Funcionales y/o Proteómicos

Las aplicaciones preferidas para la célula u organismo de la invención es el análisis de los perfiles de expresión de gen y/o proteomas. En una realización especialmente preferida se lleva a cabo un análisis de una variante o forma mutante de una o varias proteínas objetivo, en donde dicha variante o formas mutantes se reintroducen dentro de la célula u organismo mediante un ácido nucleico objetivo exógeno como se describió anteriormente. La combinación de knockout de un gen endógeno y de rescate al utilizar el objetivo mutado, por ejemplo parcialmente eliminado exógeno que tiene ventajas cuando se compara con el uso de una célula knockout. Adicionalmente, este método es particularmente adecuado para identificar dominios funcionales de la proteína objetivo. En una realización preferida 20 adicional se lleva a cabo una comparación, por ejemplo de los perfiles de expresión de gen y/o proteomas y/o características fenotípicas de por lo menos dos células u organismos. Estos organismos se seleccionan de: (i) una célula de control o organismos de control sin la inhibición del gen objetivo, (ii) una célula u organismo con la inhibición del gen objetivo y (iii) una célula u organismo con la inhibición del gen objetivo más la complementación del gen objetivo mediante un ácido nucleico objetivo exógeno.

30 Adicionalmente, el método de complementación de ARN knockout se puede utilizar para sus propósitos preparativos, por ejemplo para la purificación de afinidad de las proteínas o complejos de proteína de células eucarióticas, particularmente células de mamífero y más particularmente células de humano. En esta realización de la invención, el ácido nucleico objetivo exógeno codifica preferiblemente una proteína objetivo que se fusiona para etiqueta de afinidad de la técnica. Este método es adecuado para análisis de proteoma funcional en células de 35 mamífero, particularmente células de humano.

Otra utilidad de la presente invención puede ser un método para identificar la función de gen en un organismo que comprende el uso de un agente ARNi para inhibir la actividad de un gen objetivo de la función previamente desconocida. En lugar del consumo de tiempo y el aislamiento laborioso de mutantes mediante detección genética tradicional, los genómicos funcionales preverían determinar la función de genes no caracterizados al emplear la invención para reducir la cantidad y/o alterar el tiempo de la actividad del gen objetivo. La invención se puede utilizar para determinar objetivos potenciales para farmacéuticos, bajo reposo normal y eventos patológicos asociados con el desarrollo, rutas de señalización determinante responsables para desarrollo/envejecimiento postnatal, y similares. La velocidad incrementada para adquirir la información de secuencia de nucleótido de las fuentes de gen genómicas y expresadas, incluyendo las secuencias totales para la levadura, *D. melanogaster*, y genomas *C. elegans*, se puede 40 acoplar con la invención para determinar la función de gen en un organismo (por ejemplo, nemátodo). La preferencia de diferentes organismos para utilizar codones particulares, la búsqueda de bases de datos de secuencia para productos de gen relacionados, que correlaciona el mapa de ligado de rasgos genéticos con el mapa físico del cual se derivan las secuencias de nucleótido, y los métodos de inteligencia artificial se pueden utilizar para definir los cuadros de lectura abierta putativos de las secuencias de nucleótido adquiridas en tales proyectos de secuenciamiento. Un ensayo simple inhibiría la expresión de gen de acuerdo con la secuencia parcial disponible de una etiqueta de secuencia expresada (EST). Las alteraciones funcionales en el crecimiento, desarrollo, metabolismo, resistencia a la enfermedad, u otros proceso biológicos serán indicadores del papel normal del producto de gen de EST.

55 El caso con el que el ARN se puede introducir en una célula intacta/organismo que contiene el gen objetivo permite a la presente invención ser utilizada en detección de alto rendimiento (HTS). Las soluciones que contienen los agentes ARNi que son capaces de inhibir los diferentes genes expresados se pueden colocar en placas individuales posicionadas en una placa microtítulo como una disposición ordenada, y las células intactas/organismos en cada

pozo se pueden evaluar para cualesquier cambios o modificaciones en el comportamiento o desarrollo debido a la inhibición de la actividad del gen objetivo. El ARN amplificado se puede cargar directamente a, inyectar en, la célula/organismo que contiene el gen objetivo. Alternativamente, el agente ARNi se puede producir de un vector, como se describe aquí. Los vectores se pueden inyectar en, la célula/organismo que contiene el gen objetivo. La función del gen objetivo se puede evaluar de los efectos que este tiene en la célula/organismo cuando se inhibe la actividad del gen. Esta detección puede ser susceptible para sujetos pequeños que se pueden procesar en gran número, por ejemplo: arábido, bacterias, drosófila, hongos, nemátodos, virus, pez cebra, y células de cultivo de tejido derivadas de mamífero. Un nematodo u otro organismo que produce una señal colorimétrica, fluorogénica, o luminiscente en respuesta a un promotor regulado (por ejemplo, transfectado con una construcción de gen reportero) se puede evaluar en su formato HTS.

La presente invención puede ser útil en permitir la inhibición de los genes esenciales. Tales genes se pueden requerir para viabilidad celular o de organismo en solo etapas particulares de desarrollo o compartimientos celulares. El equivalente funcional de mutaciones condicionales se puede producir al inhibir la actividad del gen objetivo cuando o este no se requiere para viabilidad. La invención permite la adición del agente ARNi en tiempos específicos de desarrollo y ubicaciones en el organismo sin introducir mutaciones permanentes dentro del genoma objetivo.

IX. Ensayos de Detección

Los métodos de la invención también son adecuados para uso en métodos para identificar y/o caracterizar agentes farmacológicos potenciales, por ejemplo identificar nuevos agentes farmacológicos de una colección de sustancias de prueba y/o caracterizar mecanismos de acción y/o efectos colaterales de agentes farmacológicos conocidos.

Así, la presente invención también se relaciona con un sistema para identificar y/o caracterizar agentes farmacológicos que actúan en por lo menos una proteína objetivo que comprende:

(a) una célula eucariótica o un organismo no humano eucariótico capaz de expresar por lo menos un gen objetivo endógeno que codifica dicha proteína objetivo, (b) por lo menos una molécula de agente ARNi capaz de inhibir la expresión de dicho por lo menos un gen objetivo endógeno, y (c) una sustancia de prueba o una colección de las sustancias de prueba en donde las propiedades farmacológicas de dicha sustancia de prueba o dicha colección se identifican y/o se caracterizan. Adicionalmente, el sistema como se describió anteriormente preferiblemente comprende: (d) por lo menos un ácido nucleico objetivo exógeno que codifica el objetivo proteína o una variante o forma mutada de la proteína objetivo en donde dicho ácido nucleico objetivo exógeno difiere del gen objetivo endógeno en el nivel de ácido nucleico de tal manera que la expresión del ácido nucleico objetivo exógeno se inhibe menos sustancialmente por el agente ARNi que la expresión del gen objetivo endógeno.

Los compuestos de prueba de la presente invención se pueden obtener utilizando cualquiera de los numerosos métodos en métodos de colección combinatoria conocidos en la técnica, incluyendo: colecciones biológicas; colecciones de fase de solución o de fase sólida paralela espacialmente direccionable; métodos de colecciones sintéticas que requieren desconvolución; el método de colección de un compuesto un glóbulo; y métodos de colección sintética utilizando selección de cromatografía de afinidad. El método de colección biológica se limita a colecciones de péptido, aunque los otros cuatro métodos son aplicables a las colecciones de péptido, oligómero no péptido o molécula pequeña de los compuestos (Lam, K.S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145).

Ejemplos de métodos para la síntesis de colecciones moleculares se pueden encontrar en la técnica, por ejemplo en: DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6909; Erb et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann et al. (1994). *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho et al. (1993) *Science* 261:1303; Carrell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; y in Gallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233.

Las colecciones de compuestos pueden estar presentes en la solución (por ejemplo, Houghten (1992) *Biotechniques* 13:412-421), o en glóbulos (Lam (1991) *Nature* 354:82-84), chips (Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), bacterias (Ladner USP 5,223,409), esporas (Ladner USP '409), plásmidos (Cull et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869) o en fago (Scott y Smith (1990) *Science* 249:386-390); (Devlin (1990) *Science* 249:404-406); (Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382); (Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310); (Ladner supra.).

En una realización preferida, la colección es una colección de producto natural, por ejemplo, una colección producida por un cultivo de bacterias, hongos, o levadura. En otra realización preferida, la colección es una colección de compuesto sintético.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se deben construir como limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo I: Dúplex siARN Funcionalmente Asimétricos

Para evaluar cuantitativamente si las dos hebras de un dúplex siARN son igualmente competentes para dirigir ARNi, se examinan los índices individuales de división objetivo codificante y anticodificante para un dúplex siARN se dirige
 5 contra el mRNA de luciferasa de luciérnaga (Figura 1A). Las porciones relevantes de las secuencias de ARN objetivo codificante y anticodificante se muestran en la Figura 1A y la secuencia de siARN en la Figura 1B. Este dúplex siARN silencia efectivamente la expresión de luciferasa de luciérnaga en células de cultivo humano HeLa. Utilizando un embrión derivado de *Drosophila* en reacción ARNi in vitro, se encuentra una diferencia significativa en el índice de división objetivo para las dos hebras siARN; la hebra siARN anticodificante dirige más eficientemente el ARNi contra
 10 un objetivo ARN codificante que la hebra siARN codificante para un objetivo anticodificante (Figura 1B). (Las hebras siARN anticodificante y los objetivos de ARN codificantes siempre se muestran en negro, y los siARN codificantes y los objetivos anticodificantes, en gris). Los experimentos de control muestran que utilizando los dúplex siARN con los fosfatos 5' no altera este resultado (datos no mostrados), lo que indica que índices diferentes de fosforilación para las dos hebras no origina la asimetría observada. De forma sorprendente, las dos hebras del dúplex siARN del dúplex luciferasa, utilizadas individualmente como hebras únicas fosforiladas 5', tiene índices idénticos de división objetivo (Figura 1C). El ARNi dirigido mediante el siARN monocatenario es aproximadamente 10- veces menos eficiente que el activado mediante los dúplex siARN, reflejando – 100 veces menos estabilidad de los siARN monocatenarios in vitro e in vivo (Schwarz et al., 2002). La diferencia en el índice de división dirigido mediante las hebras anticodificantes y codificantes cuando la reacción se programa con un dúplex siARN es poco probable que refleje una diferencia en la susceptibilidad inherente de los dos objetivos para ARNi. En su lugar, la observación que las mismas dos hebras siARN son igualmente efectivas como monocatenarios, pero muestra actividades dramáticamente diferentes cuando hace par con cada uno, lo indica que la asimetría en su función se establece en una etapa en la ruta ARNi antes del encuentro del RISC programado con su objetivo ARN correspondiente.

Ejemplo II: Ensamble diferencial de conteos RISC para asimetría funcional de la hebra siARN

Para identificar la fuente de asimetría en la función de este dúplex siARN, el desenrollado de las dos hebras siARN cuando el dúplex se incuba en un estándar in Vitro. Se mide la reacción ARNi. Este ensayo se muestra previamente para determinar exactamente e la fracción de siARN que se desenrolla en una etapa dependiente de ATP en la ruta ARNi; el RISC no funcional se ensambla en la ausencia de ATP (Nykänen et al., 2001). Los estudios previos muestran que el desenrollamiento del siARN se correlaciona con la capacidad de un siARN para funcionar en la división objetivo (Nykänen et al., 2001; Martinez et al., 2002), demostrando que el desenrollamiento del dúplex siARN se requiere para ensamblar un RISC competente para el par base con su ARN objetivo. Aquí, se mide la acumulación del siARN monocatenario del dúplex siARN de luciferasa después de 1 hora de incubación en una reacción de ARNi in vitro en la ausencia de ARN objetivo. Después de una hora de incubación con el lisato de embrión *Drosophila* en una reacción de ARNi estándar, 22% de la hebra anticodificante del siARN luciferasa se convierte a monocatenario (Figura 1D; 'siARN B' barra negra sólida). Remarcablemente, no se detecta una cantidad correspondiente de siARN codificante monocatenario. En su lugar, solo 3% de la hebra codificante acumulada como siARN monocatenario (Figura 1D; 'siARN B' barra gris sólida). En experimentos de control, no se detecta ARN monocatenario sin incubación en el lisato (no mostrado), demostrando que el siARN es completamente monocatenario en el inicio de la reacción. Debido a que la producción del siARN anticodificante monocatenario se puede acompañar por una cantidad igual de siARN codificante monocatenario, la hebra codificante perdida se ha destruido después de desenrollado.

Para establecer que la asimetría observada en la acumulación de los dos monocatenarios no es un artefacto de nuestro ensayo de desenrollamiento, es un método independiente para medir la fracción de siARN presente como monocatenarios en los complejos de ARN-proteína. En este ensayo, el siARN bicatenario se incuba con el lisato de embrión *Drosophila* en una reacción de ARNi estándar durante 1 h, luego se agrega un oligonucleótido de ARN 31 nt 2'-O-metilo que contiene una secuencia 21 nt complementaria a la hebra siARN radiomarcada. No se dividen los oligonucleótidos 2'-O-metilo mediante la maquinaria de ARNi, pero se pueden unir establemente al siARN complementario dentro del RISC (Martin Simard, GH, Craig Mello, y PDZ, manuscrito en preparación). Para permitir la recuperación del RISC, el oligonucleótido 2'-O-metilo fue anclado a un cordón magnético por medio de un ligado de biotina-estreptavidina. Después de lavado se mide el ARN no vinculado y la proteína, la cantidad de siARN radioactivo unido al glóbulo. El ensayo se desarrolla con dúplex siARN separados en los que la hebra codificante o anticodificante es 5' -32P-radiomarcada. La captura del 32P-siARN se observa cuando el oligonucleótido 2'-O-metilo contiene una región 21-nt complementaria en la hebra siARN radiomarcada, pero no cuando se utiliza un oligonucleótido no relacionado. El ensayo captura toda la actividad de RISC dirigida mediante la hebra siARN complementaria con el oligonucleótido atado, demostrando que este mide el siARN presente en el lisato como complejo monocatenario con proteínas RISC. Este ensayo captura los resultados del ensayo de desenrollado descrito anteriormente: para el siARN en la Figura 1D; 'si ARN B' barras abiertas, casi diez veces más del siARN anticodificante se detecta de la hebra codificante. Una explicación de estos resultados es que las dos hebras de este dúplex siARN se cargan diferencialmente en el RISC, y que se degrada el siARN monocatenario no ensamblado en RISC. La asimetría funcional ocurre solo cuando el siARN activado es bicatenario, no cuando las dos hebras siARN

se prueban individualmente (Fig. 1B y 1C). Así, el ensamble simétrico de RISC es un rasgo del dúplex siARN, que de las secuencias de las hebras siARN individuales o la capacidad de acceso de los sitios objetivo para la división.

Ejemplo III: Formación de par base en el extremo 5' del ensamble RISC de la puerta de hebra siARN

5 El hallazgo que las dos hebras siARN pueden tener diferentes capacidades para formar RISC cuando se forman
 pares en un dúplex indica que algún rasgo de los 19 pares base del dúplex determina la asimetría funcional. Estos
 pares base se debe interrumpir para producir el RISC (Nykänen et al., 2001), que contiene siARN monocatenario
 (Martinez et al., 2002). Los siARN utilizados en la Figura 1B se examinan para par base que caracteriza que se
 puede distinguir de las dos hebras siARN. Para el siARN en la Figura 1B, el extremo 5' de la hebra siARN
 10 anticodificante empieza con U y así se hacen pares para la hebra siARN codificante mediante un par base A:U (2
 enlaces de hidrógeno). En contraste, el nucleótido 5' de la hebra siARN codificante se liga a la hebra anticodificante
 mediante un par base C:G (3 enlaces de hidrógeno). La hebra siARN codificante forma 8-10 veces menos de RISC y
 guía la división de su objetivo ARN en un índice correspondientemente más lento que la hebra anticodificante. Una
 hipótesis de trabajo para explicar la asimetría funcional observada, es que la hebra siARN cuyo extremo 5' es más
 débilmente vinculado a la hebra complementaria que se incorpora más fácilmente en el RISC. En esta vista, las
 15 longitudes de par base relativas del extremo 5 de las dos hebras siARN determinarán su grado relativo de la
 formación de RISC.

Como una prueba inicial de esta idea, el nucleótido 5' de la hebra codificante siARN se cambia de C a U (Figura 1E).
 Esto cambia el par base formado entre el mayor nucleótido 5' de la hebra codificante y la posición 19 de la hebra
 anticodificante del par base Watson-Crick C:G al par más débil, U:G oscilante menos estable, mientras se deja no
 20 alterada la hebra anticodificante del siARN. Remarcablemente, el cambio de este nucleótido único no solo mejora el
 índice de división dirigido mediante la hebra codificante, pero virtualmente elimina la capacidad de la hebra
 anticodificante para dirigir ARNi (Figura 1E).

Para determinar la bases para la asimetría funcional inversa para el siARN en la Figura 1E, se determina la cantidad
 de cada hebra que es monocatenaria después de incubación del dúplex siARN en el lisato de embrión Drosophila.
 25 Después de 1h, cerca del 30% de la hebra siARN codificante que se convierte a la hebra monocatenaria, pero no la
 hebra anticodificante monocatenaria se detecta (Figura 1D; 'siARN E'). Por lo tanto, el explicación más simple para
 la función asimétrica de este siARN es que la hebra codificante, pero no la anticodificante, de este dúplex siARN se
 incorpora en RISC. Así, una única mutación de nucleótido en la hebra siARN codificante del siARN en la Figura 1B
 30 reversa completamente las capacidades relativas de las dos hebras para ensamble en el complejo de enzima que
 dirige el ARNi.

La estabilidad de los cinco pares base iniciales de las hebras siARN se calcula en la Figura 1 utilizando el método
 nearestneighbor el algoritmo m veces (D.H. Mathews, 1999; Zuker, 2003). El extremo 5' de la hebra siARN
 codificante en la Figura 1E, pero no en la 1B, se predice que existe como un equilibrio de dos conformadores de casi
 35 energía igual (Figura 10). En un conformador, el nucleótido 5' de la hebra codificante se vincula a la hebra
 anticodificante mediante un par U:G oscilante, aunque en el otro conformador en el extremo 5' de esta hebra siARN
 no tiene par. El análisis sugiere que el ensamble de RISC favorece la hebra siARN cuyo extremo 5' tiene una mayor
 propensión al desgaste.

Para probar esta hipótesis adicional, se examinan los índices específicos de la hebra de la división de Cu humano
 codificante y anticodificante, Zn superóxido dismutasa-1 (sod1) los objetivos de ARN (Figura 3A) que se activan por
 40 el dúplex siARN mostrado en la Figura 3B. Dado que el extremo 5' de las hebras siARN de este dúplex están en los
 pares base G:C, este anticipa que este dúplex no exhibe asimetría de división objetivo pronunciada. Como se
 muestra en la Figura 3B, las dos hebras son similares en sus índices de división objetivo, aunque el índice de
 división anticodificante dirigida por la hebra codificante es claramente más rápido que el índice de división objetivo
 45 codificante guiada por la hebra anticodificante. Este pequeña diferencia en el índice se explica más fácilmente por la
 hebra codificante que forma 20 pares base con su ARN objetivo, aunque la hebra anticodificante puede formar solo
 19, consistente con reportes previos que la posición penúltima de un siARN hace una contribución pequeña para su
 eficacia (Elbashir et al., 2001b). Luego, la C en la posición 19 de la hebra codificante se cambia a A, originando que
 la hebra anticodificante inicie con un nucleótido sin par. Este cambio, que se hace a la hebra codificante del siARN,
 origina el índice de división objetivo guiada por la hebra siARN anticodificante por ser dramáticamente mejorada y el
 50 índice de hebra codificante se suprime (Figura 3C). Debido a que el mejoramiento de división objetivo codificante se
 origina por una mutación en la hebra siARN codificante, que no participa en el reconocimiento del objetivo
 codificante, el efecto de la mutación puede ser una etapa en la ruta ARNi que está espacialmente o temporalmente
 acoplada al siARN desenrollado. Sin embargo, la supresión de la división objetivo anticodificante claramente ha
 resultado del emparejamiento incorrecto de nucleótido única entre la hebra codificante y su ARN objetivo generado
 55 por la sustitución C-a-U.

Para probar si la supresión del índice de división objetivo anticodificante es una consecuencia de la posición 19 del
 emparejamiento incorrecto, se utiliza una estrategia diferente en un extremo sin par 5' de la hebra anticodificante. La
 Figura 3D muestra un siARN en el que la hebra codificante es idéntica a aquella en la Figura 3B, pero el primer

nucleótido de la hebra anticodificante se ha cambiado de G a U, creando un emparejamiento incorrecto U-C en su extremo 5', en el lugar del G-A de la Figura 3C. No obstante, este dúplex siARN muestra asimetría pronunciada, con la hebra anticodificante que guía la división objetivo a la exclusión cercanamente completa de la hebra codificante (Figura 3D). Así, la supresión del índice de división de la hebra codificante en la Figura 3C no es una consecuencia de la posición del emparejamiento incorrecto 19. Este hallazgo es consistente con los estudios previos que sugieren que los emparejamientos incorrectos con el ARN objetivo son bien tolerados si ellos ocurren cerca al extremo 3' de la hebra guía siARN (Amarzguioui et al., 2003). El hallazgo que los siARN en las Figuras 3C y 3D exhiben profunda asimetría demuestra que el mejoramiento del índice de división objetivo de la hebra anticodificante y la supresión de la función de la hebra codificante es una consecuencia de sus capacidades relativas para ingresar la ruta de ARNi, no su capacidad intrínseca para dirigir la división objetivo.

Finalmente, la hebra codificante de la Figura 3C hace par con la hebra anticodificante de la Figura 3D para crear el dúplex siARN mostrado en la Figura 3E. La hebra codificante de este siARN, como aquel en la Figura 3C, contiene un emparejamiento incorrecto con el objetivo anticodificante en la posición 19. Como la hebra siARN anticodificante en la Figura 3D, la hebra anticodificante contiene un emparejamiento incorrecto con el objetivo codificante en la posición 1. Este dúplex siARN dirige la división anticodificante objetivo significativamente mejor que el siARN en la Figura 3C, a pesar al hecho que los dos siARN contienen la misma hebra codificante (Figura 3E). Las Figuras 3F, G, y H muestran un análisis similar en el que el extremo 5' de la hebra codificante o posición 19 de la hebra anticodificante del siARN en la Figura 3B se altera par producir los dúplex siARN en los que el extremo 5' de la hebra codificante es completamente sin par (Figuras 3F y G) o tiene par en un par base A:U (Figura 3H). De nuevo, la carencia de par del extremo 5' de una hebra codificante de la hebra de siARN, en este caso, hace que la hebra funcione para la exclusión de la otra hebra. Cuando el extremo 5' de la hebra codificante está presente en un par base A:U y el extremo 5' de la hebra anticodificante 5' está en un par G:C, la hebra codificante domina la reacción (Figura 3H), aunque ahora la hebra anticodificante muestra actividad similar para aquella vista para el siARN original (Figura 3B) en el que ambas hebras son en pares G:C en sus extremos 5'. Convirtiendo el extremo 5' sin par de los siARN en la Figura 3 a un par A:U que reduce la asimetría funcional de las dos hebras para mejorar la eficacia de la hebra codificante (Figura 3E) o la hebra anticodificante (Figura 3H). El caso relativo con el cual el extremo 5 de los dos siARN que se puede liberar del dúplex determina el grado de asimetría. Los datos adicionales que soportan esta idea se muestran en la Figura 8, utilizando un siARN diferente. La Figura 8B muestra un siARN que divide los dos sod1 ARN objetivos (Figura 8A). Con asimetría funcional modesta que refleja la longitud del par base colectivo de los primeros cuatro o cinco nucleótidos de cada hebra siARN (Figura 8E; ver adelante). La asimetría se incrementa dramáticamente cuando se introduce un G:U oscilante en el extremo 5' de la hebra anticodificante del siARN (Figura 8C), pero no se ve asimetría cuando las hebras únicas individuales se utilizan para activar el ARNi (Figura 8D), demostrando que el ensamble diferencial de RISC, sin accesibilidad objetivo, explica la asimetría funcional del dúplex siARN.

Juntos, los datos en las Figuras 1, 2, y 8 indican que la asimetría del ensamble de RISC se determina mediante una competición entre el desgaste del extremo 5 de los dos siARNs en el dúplex. Tal desgaste puede iniciar un proceso direccional de desenrollado en el que la hebra en la que se inicia ingresa preferencialmente el desenrollado RISC. Tal un modelo requiere que los factores de ensamble de RISC o componentes de RISC en sí mismos se carguen en una de las dos hebras siARN antes de que se complete el desenrollado, o que la información acerca a las hebras de siARN antes del estado de formación de pares se retenga, quizás mediante una proteína tal como la helicasa que permanece vinculada a una hebra.

Ejemplo IV: Un enlace único de hidrógeno puede determinar que hebra de un dúplex siARN dirige ARNi

Para explorar esta hipótesis adicional, se hacen cambios adicionales para el siARN específico de sod1 en la Figura 3. Estas modificaciones alteran la función de las dos hebras del siARN, pero no cambian el sitio dividido de los dos ARN objetivo. En la Figura 3A, la hebra anticodificante de la Figura 3B tiene pares con una hebra codificante idéntica a aquella en la Figura 3B excepto que el 5' G se reemplaza con inosina (I). Como pares G, I con C, pero hace dos en su lugar de tres enlaces de hidrógeno. En este respecto, un par I:C es similar en energía a un par A:U. El siARN resultante es funcionalmente asimétrico, cuando la hebra codificante empieza con un I, este dirige división objetivo más eficientemente que la hebra anticodificante (Figura 4A). La asimetría refleja un mejoramiento en la eficacia de la hebra siARN codificante, con poca pérdida en la función de la hebra anticodificante. Una inosina en el extremo 5' de la hebra anticodificante tiene el efecto opuesto. Cuando la G en la posición 1 de la hebra anticodificante se sustituye con inosina y la hebra codificante es aquella de la Figura 3B, la hebra anticodificante se mejora con relación a la hebra codificante (Figura 4B). Así, la hebra cuyo extremo 5' está en el par base más débil es más efectiva en la división objetivo. Remarcablemente, cuando los nucleótidos 5' de ambas hebras de siARN se acoplan en los pares base I:C (Figura 4C), la eficacia relativa de las dos hebras siARN se restaura en aquella reportada en la Figura 3B. El índice ligeramente más rápido para división objetivo anticodificante que para la división objetivo codificante también se ve para el ARNi activado con las hebras únicas que contienen inopina individuales, lo que indica que esto refleja una diferencia en la capacidad intrínseca de las dos hebras para guiar la división, que una diferencia en el ensamble de RISC. Aunque los índices relativos de la división de las dos hebras son comparables para los siARN en la Figura 3B y 4C, los índices absolutos son más rápidos para el siARN en la Figura 4C. Estos datos indican que la producción de FISC de una hebra individual se gobierna por la propensión relativa del extremo 5' del siARN al

desgaste comparado con aquel de su hebra complementaria y mediante la propensión absoluta del extremo 5' de siARN al desgaste. Este último hallazgo es particularmente inesperado, porque muestra que una diferencia en el enlace de hidrógeno único tiene un efecto marcado en el índice del ensamble de RISC. El desgaste de extremo siARN proporciona un sitio de entrada para una helicasa de ARN dependiente de ATP que desenrolla los dúplex siARN (Figura 4). La helicasa hace muchos intentos frustrados para disociar las dos hebras de siARN antes de lograr cargar una hebra en RISC. El involucramiento de una helicasa en el ensamble de RISC se soporta mediante las observaciones previas: (1) desenrollado de siARN y la producción del RISC funcional requiere ATP in vitro (Nykänen et al., 2001) y (2) varias proteínas con homología de secuencia para helicasas de ARN dependientes de ATP se han implicado en el silenciamiento de ARN (Wu-Scharf et al., 2000; Dalmay et al., 2001; Hutvágner y Zamore, 2002; Ishizuka et al., 2002; Kennerdell et al., 2002; Tabara et al., 2002; Tijsterman et al., 2002).

El efecto de los emparejamientos incorrectos de nucleótido único en esta región del siARN, utilizando una serie de siARN que contiene un emparejamiento incorrecto en la segunda, tercera, o cuarta posición de cada hebra siARN se prueba adicionalmente. Los siARN que llevan pares G:U oscilantes en la segunda, tercera o la segunda y tercera posiciones (Figura 11) también se analiza. Los resultados de esta serie demuestran que los emparejamientos incorrectos, pero no G:U oscilantes, en las posiciones 2-4 de una hebra siARN alteran la carga relativa de las dos hebras siARN en RISC. Los emparejamientos incorrectos en la posición cinco, tienen efectos muy modestos en la carga relativa de las hebras siARN en RISC (datos no mostrados). En contraste, los efectos de los emparejamientos incorrectos internos en las posiciones 6-15 no se pueden explicar mediante su influencia de la asimetría del ensamble de RISC (datos no mostrados). En suma, estos datos son consistentes con la acción de una helicasa no procesada que se puede unir a aproximadamente cuatro nucleótidos del ARN.

Ejemplo V: Implicaciones de asimetría siARN en la biogenia de miARN

Una implicación de los hallazgos presentados aquí es que aunque los siARN están predominantemente presentes como dúplex en equilibrio in vitro (Nykänen et al., 2001) y quizás in vivo (Hamilton y Baulcombe, 1999; Djikeng et al., 2001), ambas hebras de un siARN es poco probable que se presente igualmente en RISC. Esto es, la longitud de los pares bases en el extremo 5' de las dos hebras siARN puede influenciar su acumulación como monocatenarios. Cuando el extremo 5' de una hebra no tiene par, esta asimetría puede ser cercanamente absoluta. Esta observación sugiere que la incorporación asimétrica en el RISC, como una consecuencia del desenrollado direccional de un extremo desgastado de un dúplex siARN, también puede explicar porqué los miARN se acumulan como hebras únicas. Los miARN de animal se derivan de la hebra bicatenaria de ~ 70 nt tallo-bucle de ARN precursores (Lee et al., 1993; Pasquinelli et al., 2000; Reinhart et al., 2000; Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee y Ambros, 2001; Lagos-Quintana et al., 2002). Los tallos pre-miARN solo son parcialmente bicatenarios; el pre-miARN típico contiene emparejamientos incorrectos, bucles internos, y pares base G-U predichos para distorsionar una hélice de ARN con forma de A. Se generan los miARN de pre-miARN mediante la endonucleasa específica de ARN bicatenario de Dicer (Hutvágner et al., 2001; Grishok et al., 2001; Ketting et al., 2001). Se propuso previamente por los actuales inventores que los miARN sean monocatenarios debido a restricciones helicoidales de Dicer para romper solo dos, que cuatro, enlaces fosfodiéster, que produce un miARN bicatenario, que un dúplex similar a siARN (Hutvágner et al., 2001). Tal un mecanismo tiene precedentes, debido a RNasa III *E. coli* se puede restringir mediante distorsiones helicoidales para hacer solo una o dos rupturas en una cadena de ARN (Chelladurai et al., 1993).

Una hipótesis alternativa es que el Dicer divide cuatro enlaces fosfodiéster en todos sus sustratos, dsARN y pre-miARN largos, y siempre genera un producto con el dúplex siARN esencial (Hutvágner y Zamore, 2002; Reinhart et al., 2002; Lim et al., 2003b). Este mecanismo para la producción de miARN se sugiere generalmente por Bartel y colegas. Utilizando un ARN pequeño la estrategia de clonación para identificar los miARN maduros en *C. elegans*, ellos recuperan ARN pequeños que corresponden el lado no miARN del ítem precursor (Lim et al., 2003b). Aunque estas secuencias 'miARN*' se recuperan en aproximadamente 100 veces menor frecuencia que los miARN en sí mismos, ellos siempre pueden estar en pares con el miARN correspondiente para dar 'dúplex miARN' con 2 nt suspendido en el extremo 3's (Lim et al., 2003b). Estos datos sugieren que los miARN nacen como dúplex, pero se acumulan como monocatenarios debido a que algunos procesos posteriores estabilizan el miARN, desestabiliza el miARN*, o ambos.

La incorporación del miARN dentro del RISC está en este proceso. Nuestros resultados con siARN sugieren que el ensamble preferencial de un miARN en el RISC se podría acompañar por la destrucción del miARN. Si el índice de ensamble asimétrico de RISC es más rápido que la producción de los dúplex miARN, solo los miARN monocatenarios se podría observar en equilibrio (Figura 4). La acumulación de monocatenarios y no dúplex para los miARN simplemente sería una consecuencia de Dicer que es significativamente menos eficiente en dividir el pre-miARN cuando se compara con dsARN largo (Hutvágner et al., 2001). El índice de ensamble asimétrico de RISC puede ser más rápido que la producción de los dúplex miARN, ya que solo los miARN monocatenarios se observarían en equilibrio. Dos predicciones clave de esta hipótesis son que (1) el Dicer purificado debe dividir los pre-miARN en productos con cantidades de miARN y miARN* iguales y (2) los precursores pre-miARN se debe procesar mediante el Dicer en dúplex con el extremo 5' de la hebra de miARN desgastada o unida débilmente a hidrógeno y el extremo 5' de la hebra miARN* de más pares base seguros.

A. Dicer divide asimétricamente el pre-let-7

Para empezar a probar la idea que los pre-miARN se dividen mediante el Dicer para generar un producto con una estructura esencial de un dúplex siARN, incubamos la Drosophila pre-miARN, pre-let-7, con Dicer recombinante, purificado y analiza los productos mediante hibridación Northern utilizando las sondas específicas para el lado 5' del tallo precursor que codifica el let-7 maduro o para productos derivados del lado 3' del tallo precursor (productos let-7*). Como un control, el precursor ARN let-7 se incubaba en el lisato de embrión Drosophila, que captura la maduración pre-let-7 y ARNi in vitro. Como se reportó previamente, la incubación de ARN pre-let-7 en el lisato produce una única banda correspondiente para el let-7 auténtico, pero no los productos let-7* (Hutvagner et al., 2001; Figura 5A y 5B). En contraste, la incubación del pre-let-7 con Dicer produce aproximadamente cantidades iguales de los productos let-7 y let-7*. Por lo menos se generan tres ARN distintos de cada lado del tallo, que la banda única correspondiente al let-7 maduro observado en el lisato de embrión. Así, la ausencia de let-7* in vivo y en la reacción de lisato de embrión no se puede explicar por la influencia de la estructura pre-let-7 en Dicer.

B. El ensamble asimétrico de RISC explica porqué los miARN son monocatenarios

Si el Dicer divide ambos lados del tallo pre-let-7, entonces algunas etapas en la dirección 3' de la acción del Dicer seleccionan el let-7 maduro de un dúplex similar a siARN en el que el let-7 hace par con let-7*. Un buen candidato para tal una etapa sería la incorporación asimétrica de let-7 en RISC, acompañado por la degradación de let-7*. Para probar esta idea, se deduce que el siARN que se puede formar si se dividen pre-let-7 mediante el Dicer en una estructura similar a dúplex siARN. La secuencia de este 'pre-let-7 siARN,' generada por 'Dicer conceptual,' se muestra en la Figura 6A (ver adelante). Notablemente, el extremo 5' de let-7 no tiene pares en este dúplex, aunque el extremo 5' de la hebra let-7* está en un par base A:U. Los resultados presentados en las Figuras 2, 3, y 4 sugieren que esta estructura debe originar que la hebra let-7 ingrese al RISC a la exclusión cercana de la hebra let-7*, que se podría degradar posteriormente.

C. Selección de miARN versus miARN* en Drosophila

Este análisis luego se extiende a los otros genes miARN Drosophila publicados (Lagos-Quintana et al., 2001). Para cada estructura precursora, el bicatenario predicho se produce por Dicer. Estos dúplex con Dicer conceptual se muestran en la Figura 6A. Para 23 de los 27 dúplex generados mediante este análisis (incluyendo pre-let-7), la diferencia en el par base de los primeros cinco nucleótidos del miARN versus las hebras miARN* exactamente predicen el miARN, y no el miARN,* que se acumula in vivo. El análisis exitoso independiente de cada lado del tallo pre-miARN codifica el miARN maduro. Este análisis, previa observación que los únicos emparejamientos incorrectos en los primeros cuatro nucleótidos de una hebra siARN, un par inicial G:U oscilante, pero no G:U oscilantes internos, dirige la incorporación asimétrica de una hebra siARN en RISC (Figuras 1, 2, 3, 8, 9, y 11). Sin embargo, no se discierne diferencia en la propensión al desgaste del extremo 5' del miARN y las hebras * para miR-4, miR-5, los tres parálogos miR-6-2, y miR-10. Por lo tanto, no se puede explicar porqué una hebra particular se deberá acumular como el miARN maduro para estos tres precursores miARN. El miR-5 y miR-10, como otros miARN Drosophila, se identifican mediante la clonación y secuenciamiento de los ARN pequeños de embriones (Lagos-Quintana et al., 2001). Los determinantes diferentes del extremo desgastado parecen funcionar en la selección de miR-4 y miR-6; estos determinantes desconocidos también pueden jugar un papel en el ensamble de una hebra de siARN en RISC. Sin embargo, se clonan miR-5 y miR-10 solo una vez, que eleva la posibilidad que esté presente el miR-5* o miR-10* en los embriones, pero no se representan entre la colección de los ARN pequeños de los cuales se clonan los miARN. De forma similar, el miR-6 se codifica por tres genes parálogos, solo uno de los cuales predice producen cantidades detectables del miR*, ya que esta hebra * tampoco se puede haber detectado. Para probar si las hebras miARN y * se pueden acumular para algunos o todos estos tres genes, se utiliza hibridación Northern para examinar la abundancia relativa del miR-10 y miR-10* en hembras y machos adulto Drosophila, y en embriones blastodermo sincicial. Los resultados detectan el miR-10* y miR-10 in vivo (Figura 6C). De hecho, los resultados indican que más miR-10* se detecta que el miR-10 en machos adulto. Este hallazgo fortalece el propósito que los genes miARN (es decir, premiARN) se especifican únicamente en el lado del tallo de los residuos miARN al generar dúplex similares a siARN de los cuales solo una de las dos hebras del dúplex se ensambla dentro del RISC. Cuando estos intermedios bicatenarios no contienen características estructurales que aplican el ensamble asimétrico de RISC, ambas hebras se acumulan in vivo. Es posible que los pre-miARN tal como pre-miR-10, que generan bastantes cantidades iguales de productos de ARN pequeños de ambos lados del tallo precursor, simultáneamente regulan los ARN objetivos con complementariedad parcial para ambos productos de ARN pequeños.

Ejemplo VI: Índice incrementado de eficiencia siARN a través del uso de colas dTdT

Los protocolos reconocidos por la técnica para diseñar los dúplex siARN enseña la inclusión de colas dTdT (es decir, las suspensiones de 2-nucleótido que consisten de dT). Se crean dos dúplex para probar si la adición de las colas dTdT suspendidas en 3' incrementan el índice de eficiencia objetivo siARN del mRNA Cu, Zn superóxido-dismutasa-1 (Sod1). El primer dúplex contiene las hebras codificantes y anticodificantes, cada una incluye 21 nucleótidos con 19 bases complementarias más suspensiones de 2-nucleótido (las suspensiones consisten de bases en común con la secuencia objetivo). El segundo dúplex contiene las hebras codificantes y anticodificantes, cada una incluye 19

nucleótidos complementarios (en común con el objetivo Sod1), más 2-nucleótido de colas dTdT en el extremo 5' de la hebra (sin emparejamiento del objetivo Sod1). Los resultados demuestran que el índice de eficiencia siARN mejora -8 veces - cuando se utiliza el dúplex que tiene emparejamiento incorrecto de colas dTdT (Figura 12).

Discusión de los Ejemplos I-VI: Implicaciones para silenciamiento de ARN

5 Las observaciones descritas aquí proporcionan reglas para el diseño del siARN. Claramente, la estructura de siARN puede influenciar profundamente la entrada de la hebra siARN anticodificante dentro de la ruta ARNi. Así, la secuencia del siARN, de aquella del sitio objetivo, puede explicar por lo menos algunos reportes previos de dúplex de siARN inefectivos. Tales dúplex inactivos pueden ser inducidas a la vida al modificar la hebra codificante del siARN para reducir la longitud del par base en el extremo 5' de la hebra anticodificante. Un ejemplo de este in vitro se muestra en la Figura 9, para un siARN inefectivo dirigido contra el mRNA huntingtin (htt) (Figura 9A). El cambio de G:C (Figura 9B) a un par A:U (Figura 9C) o un emparejamiento incorrecto G-A (Figura 9D) mejora dramáticamente su índice de división objetivo in vitro y su eficacia in vivo (Eftim Milkani, NA, y PDZ, observaciones no publicadas). De hecho, Khvorova y colegas han encontrado que una baja estabilidad de par base en el extremo 5' de la hebra anticodificante, pero no en la hebra codificante, es un prerrequisito para la función de siARN en células de mamífero cultivadas (Anastasia Khvorova, Angela Reynolds, y Sumedha D. Jayasena, manuscrito omitido).

Los siARN diseñados para funcional asimétricamente también pueden ser uso para mejorar la especificidad de ARNi. Recientemente, los estudios del perfil de expresión han mostrado que la hebra codificante de un siARN puede dirigir silenciamiento del gen objetivo (A.L. Jackson, et al. (2003) Nature Biotechnology, May 18). Los datos presentados aquí proporcionan una estrategia para eliminar tal secuencia específica pero los efectos indeseables: rediseñando el siARN ya que solo la hebra anticodificante entra en la ruta de ARNi.

Las observaciones descritas aquí proporcionan nuevas reglas de diseño para la construcción de los ARN de horquilla pequeña (shARN), que produce los siARN transcripcionalmente en las células cultivadas o in vivo (Brummelkamp et al., 2002; McManus et al., 2002; Paddison et al., 2002; Paul et al., 2002; Sui et al., 2002; Yu et al., 2002). Las estrategias de shARN emplean típicamente un promotor Pol III que conduce la transcripción, ya que el shARN inicia con varios residuos G. Como una consecuencia, el extremo 5' del siARN se puede secuestrar en un par base G:C, que reduce significativamente la entrada de la hebra anticodificante dentro de la ruta ARNi. Para evitar este problema, la hebra anticodificante del siARN deseado se puede reemplazar en el lado 3' del bucle, con el fin de asegurar que su extremo 5' está en un A:U, a diferencia del par G:C codificado típicamente. Alternativamente, el bucle se puede diseñar para poner el extremo 5' de la hebra siARN anticodificante en un emparejamiento incorrecto o par base G-U, en el que el caso se puede poner en el lado del tallo. Más aún, un reporte reciente sugiere que algunos shARN pueden inducir la respuesta del interferón (Bridge et al., 2003). Los datos sugieren que los emparejamientos incorrectos y los pares G:U se pueden diseñar en estos shARN simultáneamente para promover la entrada de la hebra siARN correcta dentro de la ruta ARNi y para disminuir la capacidad del tallo shARN para activar respuestas específicas de no secuencia para el ARN bicatenario.

35 Finalmente, los datos identifican una etapa no anticipada en la ruta ARNi: el acoplamiento directo de siARN desarrollado para el ensamblaje de RISC. Este hallazgo sugiere que la helicasa responsable para desenrollado de los dúplex siARN se ligará íntimamente a otros componentes de la maquinaria de ARNi. La identificación de la helicasa y las proteínas con las que este funciona para ensamblar el RISC es claramente una exposición importante para el futuro.

40 Ejemplo VII: El RISC que programa siARN es una enzima

El RISC programado con ARN pequeña in vivo cataliza la destrucción del ARN objetivo in vitro sin consumir su guía de ARN pequeño (Tang et al., 2003) (Hutvagner et al., 2002). Para empezar un análisis cinético de RISC, el RISC programado in vitro con siARN es de forma similar una enzima de recambio múltiple que primero se conforma. Para construir por ingeniería una reacción de ARNi que contiene una alta concentración del sustrato con relación a RISC, se utiliza un siARN en la que hebra guía es idéntica al miARN let-7, pero no similar al miARN, el siARN let-7 tiene pares para una hebra de ARN anticodificante para let-7 (Hutvagner et al., 2002). La hebra let-7 de este siARN tiene una alta actividad de división intrínseca, pero una eficiencia reducida de incorporación en RISC (Figura 19A).

Después de incubación el let-7 siARN con el lisato de embrión Drosophila en la presencia de ATP, el ensamblaje de RISC se inactiva mediante el tratamiento con N-etil maleimida (NEM), y la cantidad de RISC generada se mide utilizando el ensayo oligonucleótido 2'-O-metilo anclaje mencionado anteriormente (Hutvagner et al., 2004; Schwartz et al., 2003) (Figura 19 B,C). La cantidad de let-7 que programa RISC se incrementa con la concentración incrementada de siARN, hasta que el ensamblaje de la reacción empieza a saturar a -50 nM, que alcanza una asíntota entre 3 y 4 nM de RISC. Utilizando 0.6 nM de RISC, >50 ciclos para el reconocimiento objetivo y se observa la división por complejo de enzima (datos no mostrados), confirmando que el RISC que programa el siARN es una enzima de recambio múltiple.

Ejemplo VIII: El Recambio múltiple se limita mediante la liberación del producto

Se desarrolla adicionalmente la evaluación de las cinéticas de la división objetivo dirigida a siARN en la presencia o ausencia de ATP (Figura 13). Se ensambla RISC en la presencia de ATP, luego la enzima que regenera energía, quinasa creatina, se inactiva con NEM, y se agota el ATP al agregar hexoquinasa y glucosa (condiciones -ATP).

5 Para las mediciones de +ATP se agrega quinasa creatina a la reacción después de tratamiento con NEM, y se omite el tratamiento con hexoquinasa. Se observa un índice más rápido de división en la presencia que en la ausencia de ATP. Esta diferencia solo es evidente tarde en el curso de tiempo de la reacción, lo que indica que el índice dependiente de ATP de la división es más rápido que el índice independiente de ATP solo en equilibrio (Figura 13 A). El análisis se repite en más detalle (Figura 13 B). En la ausencia de ATP, se observa una ráfaga de un producto dividido en la reacción recientemente, seguido por un índice más lento de -4-veces de división objetivo. No se observa ráfaga en la presencia de ATP (Figura 13A). Si la ráfaga corresponde a un recambio simple de enzima, entonces la extrapolación del índice de equilibrio más lento que regresa al eje y daría la cantidad de enzima activa en la reacción. El intercepto y en el inicio de la reacción para el índice de equilibrio es 4.9 nM, en buen acuerdo con la cantidad de RISC estimada utilizando el ensayo de oligonucleótido 2'-O-metilo anclaje (-4 nM; Figura 13 B).

15 En principio, el ATP puede mejorar el reconocimiento objetivo mediante RISC, que promueve la redistribución del complejo RISC/objetivo en una forma activa, facilita la división en sí misma, promueve la liberación de los productos de división de la hebra guía siARN, o auxiliar que vuelve almacenar el RISC en un estado catalíticamente competente después de la liberación del producto. Todas estas etapas, excepto la liberación del producto y realmacenamiento para la competencia catalítica, debe afectar el índice de reacciones múltiples y recambio simple. Por lo tanto, el índice de reacción en la presencia y en la ausencia de ATP bajo condiciones en las que se analiza el RISC que está en exceso sobre el objetivo ARN. En momentos tempranos bajo estas condiciones, el índice de reacción debe reflejar solo eventos de división de recambio simple, en cuyos eventos después de la división no determinan el índice de reacción. Utilizando condiciones de reacción de recambio simple, se observan índices idénticos de división mediada por RISC en la presencia o ausencia de ATP (Figura 13 C). Así, el ATP puede mejorar una etapa que ocurre solo cuando cada RISC cataliza múltiples ciclos de división objetivo.

Si la liberación del producto se determina por el índice para catálisis de recambio múltiple mediante RISC en la ausencia, pero no en la presencia, de ATP, entonces las modificaciones que debilitan la resistencia de la formación de pares para el ARN objetivo pueden mejorar la liberación del producto, pero no se esperaría que aceleren el regreso de RISC en un estado catalíticamente competente. Los emparejamientos incorrectos entre el siARN y su objetivo ARN en el extremo 3' de la hebra guía siARN incorpora y diseña los siARN que son funcionalmente asimétricos, que aseguran eficientemente y predeciblemente la incorporación de la hebra let-7 en RISC (Figura 14 A). Se compara la velocidad de la reacción bajo condiciones de exceso de sustrato en la presencia y en la ausencia de ATP para los siARN con cero a cuatro emparejamientos incorrectos entre la hebra guía el extremo 3' y el objetivo ARN. La división se mide de 100 y 540 s, cuando > 90% del objetivo restante no dividido, asegura que la reacción recambio múltiple está en equilibrio. Aún un único emparejamiento incorrecto 3' entre el siARN y su objetivo recambiado en el índice -ATP, con relación al índice +ATP, y los siARN con dos o más emparejamientos incorrectos no muestra diferencia significativa en relación entre la presencia y ausencia de ATP (Figura 14B). Los resultados indican que en la ausencia de ATP, la liberación del producto es la etapa que determina el índice para los siARN que coinciden completamente con sus objetivos de ARN.

40 Ejemplo IX: siARN: Complementariedad objetivo y función de RISC

Los emparejamientos incorrectos entre el siARN y su objetivo facilitan la liberación del producto, pero sin costo: el índice de reacción, independiente de la concentración de ATP, se reduce con cada emparejamiento incorrecto 3' adicional. Cuando la concentración de RISC es -16-80- veces mayor que la concentración del ARN, cada emparejamiento incorrecto adicional entre el extremo 3' de la hebra guía siARN y el objetivo ARN hace más lenta la reacción (Figura 14 C,D). Bajo condiciones de exceso de sustrato, el efecto de emparejamientos incorrectos entre el extremo 3' de la hebra guía siARN y su objetivo de ARN es más notable (Figura 15A): el índice de división más lento -20% para cada emparejamiento incorrecto adicional. Para probar los límites de la tolerancia del RISC para emparejamientos incorrectos 3', se analiza la división bajo exceso de enzima modesta (8-veces, Figura 15 B) y vasta (-80 veces, Figura 15 C y 16 C) sobre el ARN objetivo. Remarcablemente, la división se detecta para los siARN con tanto como nueve emparejamientos incorrectos 3' para el objetivo ARN (Figura 15 C y 16 C), pero solo después de 24 horas de incubación. No se detecta la división para un siARN con diez emparejamientos incorrectos 3' para el objetivo ARN (Figura 15 C).

Linsley y colegas han propuesto la subregulación dirigida a siARN de un mRNA con tan poco como once bases contiguas complementarias con la hebra guía siARN (Jackson et al., 2003). En este estudio, el objetivo mRNA en pares con ambos nts 2-5 y nts 7-17 de la hebra guía siARN, pero el emparejamiento incorrecto en nts 1 y 6 del siARN. Los resultados indican que hasta cinco bases de emparejamiento incorrecto se toleran entre el extremo 5' del siARN y su objetivo ARN (Figura 16 A,B). No se detecta la división para los siARN con seis, siete, u ocho emparejamientos incorrectos 5' para el objetivo, aún después de 24 horas de incubación. El siARN lleva ocho emparejamientos incorrectos entre su extremo 5' y el objetivo complementario let-7 es completamente activo cuando

se introducen ocho mutaciones compensatorias en el sitio de unión let-7 (Figura 15C y 16B), demostrando que la mutación del siARN no se origina por su inactividad contra el objetivo de emparejamiento incorrecto. De forma similar, cuando ocho emparejamientos incorrectos con el extremo 3' o 5' del siARN se crean al cambiar la secuencia del objetivo de ARN, se detecta la división de ARN objetivo cuando el objetivo contiene ocho emparejamientos incorrectos con el siARN el extremo 3', pero con el extremo 5' (Figura 16 B,C).

Para empezar a estimar el número mínimo de pares base entre el siARN y su objetivo que permiten la división detectable mediante RISC en 24 horas de incubación, se combinan siete, ocho, o nueve emparejamientos incorrectos 3' con números no incrementados de emparejamientos incorrectos 5' (Figura 16 C). La división se detecta para tanto como nueve emparejamientos incorrectos 3'. Sin embargo, la división no detectable ocurre cuando se combinan siete, ocho, o nueve emparejamientos incorrectos 3' con dos o más 5' emparejamientos incorrectos. En contraste, un emparejamiento incorrecto 5' única (p1) mejora la división objetivo dirigida mediante todos los tres emparejamientos incorrectos siARN 3'. Solo 6% del ARN objetivo se divide después de 24 horas cuando el siARN contiene nueve emparejamientos incorrectos 3' contiguas con el ARN objetivo, pero 10% se divide cuando el siARN contiene nueve emparejamientos incorrectos 3' y un único emparejamiento incorrecto (p1) 5'. La división se mejora de forma similar mediante la adición de un emparejamiento incorrecto p1 para siete emparejamientos incorrectos 3' (49% de división versus 75% de división a 24 horas) o para ocho emparejamientos incorrectos 3' (21% versus 42% de división a 24 horas). El hallazgo de que la no formación de pares de la primera base de la hebra guía siARN potencia la división bajo condiciones de recambio simple que ocurre un cambio conformacional en RISC durante el cual el par base p1 no llega a tener pares antes de la división. Curiosamente, el p1 se predice frecuentemente que no están en pares para los miARN vinculados a sus objetivos (Lewis et al., 2003; Rhoades et al., 2002; Stark et al., 2003).

Para los siARN que son completamente pares con sus objetivos de ARN, el fosfato sincial siempre se basa entre los nucleótidos objetivo que son pares con bases de siARN 10 y 11 (Elbashir et al., 2001; Elbashir et al., 2001). El análisis en la resolución de nucleótido única de los productos de división 5' generados por los siARN con tres, cuatro, o cinco emparejamientos incorrectos 5' (Figura 16 D) o seis emparejamientos incorrectos terminales 3' (datos no mostrados) que revelan que el fosfato sincial en el objetivo ARN permanece el mismo, aún cuando cinco 5' nts. de la hebra guía siARN son de emparejamiento incorrecto con el ARN objetivo (Figura 16 D). Como se discute adelante, este resultado indica que la identidad del fosfato sincial es una consecuencia de la estructura de RISC, que se mide del extremo 5' de la hélice formada entre el siARN y su objetivo de ARN.

Ejemplo X: Análisis cinético de catálisis RISC

Luego se estudio el papel de los nucleótidos en las regiones terminales de la hebra guía siARN en dirigir la actividad RISC. El par reducido entre un siARN y su objetivo puede interrumpir la unión del RISC para su objetivo. Alternativamente, los emparejamientos incorrectos pueden interrumpir la estructura, pero no la afinidad, de la interacción siARN/objetivo. Los siARN que coinciden completamente son para formar un par base 21, la hélice en forma de A con el ARN objetivo (Chiu et al., 2003; Shiu et al., 2002), pero hace que todas las partes de esta hélice contribuyen igualmente a la unión objetivo o hacen algunas regiones que proporcionan solo una geometría catalíticamente permisiva. Para distinguir entre estas posibilidades, se analizan las cinéticas Michaelis-Menten de la división de ARN objetivo que dirige el siARN para un siARN que coincide perfectamente y para tres emparejamientos incorrectos siARN en su terminal. Los siARN se ensamblan en RISC, luego se diluyen con el amortiguador de reacción para la concentración de RISC deseada y se mezcla con el ARN objetivo. Para cada siARN, la velocidad inicial de la reacción se determina en múltiples concentraciones del sustrato (Figura 21 A), y KM y el kcat se determina a partir ajustes lineal de mínimos cuadrados de la concentración del sustrato versus la velocidad inicial (Figura 17 A). Mediante este ensayo, se estima el KM del siARN let-7 con complementariedad completa para su objetivo es -8.4 nM (Tabla 1). No se detecta una diferencia significativa en el KM, dentro del error, entre el siARN completamente par y las variantes siARN llevan tres a cinco emparejamientos incorrectos en su extremo 3' o tres emparejamientos incorrectos en su extremo 5' (Figura 17A y Tabla 1). Para los siARN de emparejamiento incorrecto se utiliza una concentración mayor de enzima óptima con el fin de detectar la división. Por lo tanto, las mediciones KM para los siARN de emparejamiento incorrecto que representan una unión superior de los actuales valores KM.

Aunque el KM no se altera por el siARN let-7 que contiene varios emparejamientos incorrectos terminales, el número de recambio, kcat, se reduce mediante los emparejamientos incorrectos terminales (Tabla 1). Tres emparejamientos incorrectos en el extremo 3' o el extremo 5' del siARN reduce a la mitad el kcat. La introducción de cinco emparejamientos incorrectos 3' tampoco tiene efecto significativo en el KM, todavía reduce el kcat cerca de 17 veces (Tabla 1).

La Tabla 1 resume los datos cinéticos del análisis en la Figura 17A. Para comparación, se proporcionan los valores KM y kcat de cuatro enzimas de proteína bien estudiadas. Se reportan el error de KM y kcat de ajuste.

Ejemplo XI: El KM refleja la longitud de unión de RISC

Para estimar la contribución de la unión para KM, se utiliza un ensayo de competición que mide la capacidad de oligonucleótidos 2'-O-metilo para inhibir la división objetivo mediante RISC (Figura 17 B,C). Se utiliza tal una estrategia previamente para analizar el mecanismo de destrucción objetivo mediante oligonucleótidos anticodificantes que vincula RNasa H (Lima et al., 1997). La anticipación es que los oligonucleótidos 2'-O-metilo actuarán con inhibidores competitivos de RISC, debido a que ellos unen a RISC que contiene siARN complementario pero no al RISC que contiene siARN no relacionado (Hutvågner et al., 2004; Meister et al., 2004). Se diseñan treinta y uno nt largos, oligonucleótidos 2'-O-metilo como se describió previamente (Hutvågner et al., 2004), teniendo cuidado de excluir las secuencias predichas para formar estructuras internas estables. Se seleccionan oligonucleótidos 2'-O-metilo debido a su estabilidad marcada en el lisato *Drosophila* y debido a que ellos se agregan a la reacción en concentración μM alta.

La competición mediante oligonucleótidos 2'-O-metilo y los objetivos de ARN auténticos son cuantitativamente similares. Se analizan las velocidades de reacción de la división que dirige al siARN de un objetivo radiomarcado ^{32}P en la presencia de concentraciones incrementadas del objetivo de ARN bloqueado no marcado o un 31-nt oligonucleótido 2'-O-metilo que corresponde a la región del objetivo que contiene el sitio de unión siARN (Figura 17 B). El análisis Lineweaver-Burk de los datos confirman que los oligonucleótidos 2'-O-metilo actúan como inhibidores competitivos de RISC (datos no mostrados). Estos datos se utilizan para calcular los valores K_i para el ARN que coincide perfectamente y los competidores 2'-O-metilo. Para el competidor de ARN bloqueado, el K_i es -7.7 ± 4 nM (Figura 17 B), cercanamente idéntico al KM para este siARN, 8.4 nM (Tabla 1). El K_i para el oligonucleótido 2'-O-metil competidor que coincide perfectamente es 3.2 ± 1 nM (Figura 17 B), esencialmente el mismo, dentro del error, como aquel de todo el competidor de ARN. Los resultados indican que los oligonucleótidos 2'-O-metilo son buenos modelos para objetivos de ARN 5'-bloqueado y que el KM para la división objetivo mediante RISC se determina largamente mediante la afinidad (KD) de RISC para su ARN objetivo.

Aunque los objetivos con más de cinco emparejamientos incorrectos contiguos para el extremo del siARN son sustratos pobres para la división, ellos no obstante pueden unir RISC y competir con el ARN objetivo radiomarcado ^{32}P . Se utiliza el ensayo de competición de oligonucleótido 2'-O-metilo para determinar los valores K_i para oligonucleótidos que contienen tanto como ocho emparejamientos incorrectos para la hebra guía siARN (Figura 17 B). Los oligonucleótidos 2'-O-metilo con emparejamientos incorrectos 3' terminales para el siARN son buenos competidores: cuatro emparejamientos incorrectos de nucleótido con el extremo 3' del siARN incrementa el K_i mediante solo -3-veces (9.0 ± 0.9 nM) y un emparejamiento incorrecto de ocho nucleótidos con el extremo 3' del siARN incrementa el K_i mediante -10-veces (34.8 ± 7 nM). En contraste, los emparejamientos incorrectos con el extremo 5' del siARN tienen un efecto dramático de unión. Un emparejamiento incorrecto de cuatro nucleótidos para el extremo 5' del siARN incrementa el K_i -12-veces (36.4 ± 9.2 nM) y un emparejamiento incorrecto de ocho nucleótidos para el extremo 5' del siARN incrementa el K_i 53-veces (173 ± 16 nM). El efecto diferencial en la unión entre 5' y se mantiene emparejamientos incorrectos 3' aún en el centro del siARN: un oligonucleótido 2'-O-metilo lleva cuatro emparejamientos incorrectos con nucleótidos siARN 11, 12, 13, y 14 (4 nt de emparejamiento incorrecto central 3', Figura 17 B) vinculada más fuertemente a RISC (es decir, tiene un K_i menor) que un oligonucleótido con cuatro emparejamientos incorrectos para las posiciones de siARN 7, 8, 9, y 10 (4 nt de emparejamiento incorrecto central 5', Figura 17 B).

Discusión de los Ejemplos VII-XI:

El RISC programado con siARN exógeno es una enzima, capaz de múltiples rondas de división objetivo. Los estudios previos han demostrado que la división de un ARN objetivo mediante RISC no requiere ATP (Nykänen et al., 2001; Tomari et al., 2004). El análisis de cinética más detallado presentado aquí indica que no existen etapas asistidas para ATP en el reconocimiento objetivo o la división mediante *Drosophila* RISC; no hay diferencia en el índice en la presencia o ausencia de ATP para reacciones ARNi analizadas bajo condiciones de exceso de sustrato en puntos de tiempo tempranos (pre-equilibrio) o bajo condiciones de exceso de enzima en donde se detecta la reacción que es esencialmente de recambio simple. En contraste, el índice de equilibrio de división bajo múltiples condiciones de recambio se mejora cuatro veces mediante ATP. Los resultados indican que la liberación de los productos de la endonucleasa RISC se determina bajo estas condiciones en la ausencia de ATP, pero no en la presencia de ATP. La explicación más directa para este hallazgo es que una helicasa de ARN dependiente de ATP facilita la disociación de los productos de división objetivo del siARN vinculado a RISC. El involucramiento de tal una helicasa dependiente de ATP en ARNi in vivo puede explicar porqué los siARN pueden ser activos dentro de un amplio rango de contenido GC (Reynolds et al., 2004).

En la presencia de ATP, el RISC *Drosophila* que programa el siARN es una enzima Michaelis-Menten clásica. La hebra guía del siARN estudiada aquí tiene la secuencia de let-7, un miARN endógeno. In vivo, el let-7 no es para dirigir la división de mARN, pero se considera que reprime la traducción productiva de sus objetivos mARN. No obstante, estudiamos los siARN let-7 que están entre los siARN más potentes in vitro y proporcionan un buen modelo para el siARN efectivo en general. Con un k_{cat} de -7×10^{-3} s $^{-1}$, el RISC que programa el siARN let-7 se compara más lento con enzimas con sustratos de molécula pequeña (Tabla 1). El KM para este RISC es -8 nM. Las enzimas tienen típicamente valores KM entre 1- y 100-veces más que las concentraciones fisiológicas de sus sustratos (Stryer et al., 1981). Los resultados indican que el RISC no es la excepción: las especies de mARN

abundantes individuales están presentes en células eucarióticas en concentración alta pM o baja nM. El KM de RISC se determina más fácilmente mediante la longitud de su interacción con el ARN objetivo, debido a que el KM es casi idéntico al Ki de un inhibidor oligonucleótido 2'-O-metilo no divisible.

5 Recientemente, un estudio de los parámetros cinéticos de la división de ARN objetivo mediante RISC humano como se describe (Martinez et al., 2004). En este estudio, el RISC humano activo mínimo es altamente purificado; en este estudio, la actividad de *Drosophila* RISC se mide para el no purificado, holo-RISC intacto, que se considera que es un complejo multi-proteína 80S (Pham et al., 2004). Se utilizan diferentes siARN en los dos estudios. No obstante, los valores KM y kcat reportados aquí y para el RISC humano mínimo son remarcablemente similares: el KM es 2.7-8.4 nM y el kcat es 7.1×10^{-3} seg⁻¹ para el siARN let-7 siARN que programa *Drosophila* holo-RISC versus un KM de 1.1-10 2.3 nM y un kcat de 1.7×10^{-2} seg⁻¹ para un siARN diferente en el RISC humano mínimo. Como en este estudio, se observa una ráfaga en pre-equilibrio en la ausencia de ATP, consistente con la idea que producto liberado asiste el ATP in vivo.

15 La relación de kcat a KM es una medición clásica de eficiencia de enzima y corresponde al segundo orden de índice constante para la reacción cuando la concentración del sustrato es mucho menor que el KM. Para el let-7 que programa el RISC, el kcat KM-1 es igual a -8.4×10^5 M⁻¹s⁻¹ (-8.4×10^{-4} nM⁻¹ s⁻¹), un valor más lento que el índice esperado de colisión de RISC -1 con mARN, $=10^7$ M⁻¹ s. Es posible que el índice de catálisis mediante RISC se restringe mediante el índice de cambios conformacionales requeridos para la formación del complejo de enzima-sustrato o mediante las redistribuciones conformacionales posteriores requeridas para catálisis. Es posible que se puedan diseñar los siARN que mejoran significativamente el kcat o KM de RISC sin comprometer la especificidad.

20 Aunque los siARN típicamente se prevé para unir sus objetivos ARN a través de 19 a 21 pares base complementarios, encontramos que las regiones 5', central, y 3' del siARN hacen distintas contribuciones a la unión y catálisis (Figura 18). Las mediciones del KM y Ki sugieren que los nucleótidos 5' del siARN contribuyen más a la unión objetivo que los nucleótidos 3'. Por lo menos para el siARN examinado aquí, los primeros tres y los últimos cinco nucleótidos de un 21 nt siARN contribuyen a poca unión. Si el KD de RISC vinculado a su ARN objetivo es esencialmente este KM, -8 nM, luego la energía libre ($G^\circ = RT \ln KD$) de la interacción RISC: objetivo que programa el let-7 es aproximadamente -11 kcal mol⁻¹, considerablemente menos que el -35 kcal mol⁻¹ (KD -10-29) predice 32 para el ARN let-7 vinculada al ARN completamente complementario en 100 mM K⁺ y 1.2 mM Mg²⁺ a 25°C. Es posible que el RISC deseché energía de unión potencial mediante unión menos fuertemente a su objetivo, un siARN en RISC gana la capacidad de discriminar entre objetivos pobremente coincidentes y bien coincidentes, pero solo 30 para bases en la región 5' de la hebra guía siARN.

Los emparejamientos incorrectos entre las regiones central y 3' de un siARN y su ARN objetivo reduce kcat más rápido que emparejamientos incorrectos en el extremo 5' del siARN. Estos resultados se fijan bien con los hallazgos recientes mediante Doench y Sharp que la represión traduccional mediante siARN, diseñada para actuar como miARN de animal, se interrumpe dramáticamente mediante emparejamientos incorrectos con el extremo 5' del 35 siARN, pero no con emparejamientos incorrectos similares en el extremo 3'18. Estos autores proponen que la unión de miARN mediado principalmente mediante nucleótidos en el extremo 5' del ARN pequeño. De hecho, la complementariedad entre el extremo 5' de los miARN y sus objetivos han sido requeridos para todos los métodos computacionales para predecir los objetivos de miARN animal (Rajewsky et al., 2004; Lewis et al., 2003; Stark et al., 2003; Enright et al., 2003). El descubrimiento actual que las secuencias de siARN central y 3' pueden ser pares con la secuencia objetivo para la división objetivo efectiva pero no para la unión objetivo que refuerza esta vista; las 40 secuencias miARN central y 3' son usualmente emparejamientos incorrectos con sus sitios de unión en sus objetivos naturales (Lee et al., 1993; Reinhart et al., 2000; Brennecke et al., 2003; Abrahante et al., 2003; Vella et al., 2004; Xu et al., 2003; Johnston et al., 2003).

45 La formación de una hélice en forma de A contigua que rodea el fosfato sincial del mARN objetivo se ha propuesto ser la etapa de control de calidad para la división objetivo mediada por RISC (Chiu et al., 2003). La actual invención descubre que el RISC puede dirigir la división cuando el siARN es par con el ARN objetivo solo a nts 2-12 de la hebra guía, que corresponde a un giro completo de una hélice ARN:ARN. Esta región del siARN incluye nts 2-8, que parece ser crítico para el reconocimiento del miARN de los objetivos de mARN para la represión traduccional, más dos nts que flanquean el lado del fosfato sincial. La actual invención descubre adicionalmente que no tienen par en 50 el primer nt de la hebra guía que mejora la actividad de los siARN con siete, ocho o nueve emparejamientos incorrectos 3' para el objetivo ARN es notable, ya que muchos miARN no son pares con sus objetivos en esta posición. Adicionalmente, tal formación de pares se parece a lo reportado por Linsley y colegas para los efectos objetivo dirigidos por siARN en células de mamífero cultivadas (Jackson et al., 2003).

55 El requerimiento para un giro completo de una hélice puede reflejar un mecanismo de 'control de calidad' mediante RISC. Ya que el RISC se puede ensamblar evidentemente en cualquier secuencia de siARN, este puede usar la estructura del par siARN para su objetivo para determinar si o no se divide. A pesar de la evidente vigilancia de la estructura del par siARN/objetivo, la identidad del fosfato sincial no se altera mediante emparejamiento incorrecto extensivo entre el extremo 5' del siARN y su objetivo. Todavía el fosfato sincial se determina mediante su distancia del extremo 5' de la hebra guía siARN (Elbashir et al., 2001; Elbashir et al., 2001). La explicación más simple para el

descubrimiento actual es que el fosfato sincicial se identifica mediante una proteína cargada dentro del siARN durante el ensamble de RISC, es decir, antes del encuentro del RISC con su ARN objetivo.

La Tolerancia destacada de RISC para emparejamientos incorrectos entre el siARN y sus objetivos-hasta nueve nucleótidos 3' contiguos-implica que un gran número de genes objetivo se debe esperar para muchas secuencias siARN cuando está presente el RISC en exceso sobre sus objetivos de ARN. Sin embargo, el RISC con emparejamientos incorrectos extensivos entre el siARN y el objetivo son muy lentas para dividir, ya que los efectos objetivo se puede minimizar al mantener la cantidad de RISC tan bajo como sea posible. Estos entendimientos de la base molecular del silenciamiento del gen dirigido a siARN El experto en la materia en crear los siARN diseñados para balancear las demandas competidoras de eficacia de siARN y especificidad.

10 Procedimientos Experimentales

A. Métodos Generales

La preparación del lisato de embrión *Drosophila*, se llevan a cabo reacciones ARNi in vitro, y marcado de tapa de ARN objetivos utilizando Guanilil transferasa como se describió previamente (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). Se utilizan ARN objetivos en una concentración de -5 nM para asegurar que las reacciones ocurren bajo condiciones de recambio simple. La división objetivo bajo estas condiciones se proporciona para concentraciones de siARN. Los productos de división de las reacciones de ARNi se analizan mediante electroforesis en 5% o 8% de geles acrilamida desnaturalizante. La marca de extremo 5' y la determinación del estado siARN desenrollado están de acuerdo con Nykänen et al. (Nykänen et al., 2001) excepto que se utiliza el ARN competidor no marcado en exceso molar de 100 veces. Los geles se secan, luego se exponen para placas de imagen (Fuji), que se escanean con un formador de imágenes por fósforo Fuji FLA-5000. Se analizan imágenes utilizando el Lector de Imagen FLA-5000 versión 1.0 (Fuji) y versión Image Gauge 3.45 o 4.1 (Fuji). Se desarrolla análisis de datos utilizando Excel (Microsoft) y IgorPro 5.0 (Wavemetrics).

B. Lisato de embrión *Drosophila*, la marca siARN con quinasa de polinucleótido (New England Biolabs), la preparación de ARN objetivo y la marca con guanilil transferasa se llevan a cabo como se describe (Hutvågner et al., 2002, Haley et al., 2003) y la secuencia de cebador delantera para 379 nt de mRNA objetivo es 5'-CGC TAA TAC GAC TCA CTA TAG SCAG TTG GCG CCG CGA ACG A-3', y 5'-GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG TCA CAT CTC ATC TAC CTC C-3 para el objetivo 182 nt. Los cebadores inversos utilizados para generar ARN objetivos de emparejamiento completo y de emparejamiento incorrecto son: 5'-CCC ATT TAG GTG ACA CTA TAG ATT TAC ATC GCG TTG AGT GTA GAA CGG TTG TAT AAA AGG TTG AGG TAG TAG GTT GTA TAG TGA AGA GAG GAG TTC ATG ATC AGT G-3' (coincidencia perfecta para let-7); 5'-CCC ATT TAG GTG ACA CTA TAG ATT TAC ATC GCG TTG AGT GTA GAA CGG TTG TAT AAA AGG TTG AGG TAG TAG GTT CAT GCA GGA AGA GAG GAG TTC ATG ATC AGT G-3' (7 nt de emparejamiento incorrecto 3'); 5'-CCC ATT TAG GTG ACA CTA TAG ATT TAC ATC GCG TTG AGT GTA GAA CGG TTG TAT AAA AGG TTG AGG TAG TAG GTA CAU GCA GGA AGA GAG GAG TTC ATG ATC AGT G-3' (8 nt de emparejamiento incorrecto 3'); 5'-CCC ATT TAG GTG ACA CTA TAG ATT TAC ATC GCG TTG AGT GTA GAA CGG TTG TAT AAA AGG TTG AGG TAG TAG GAA CAT GCA GGA AGA GAG GAG TTC ATG ATC AGT G-3' (9 nt de emparejamiento incorrecto 3'); 5'-CCC ATT TAG GTG ACA CTA TAG ATT TAC ATC GCG TTG AGT GTA GAA CGG TTG TAT AAA AGG TAC TCC ATC TAG GTT GTA TAG TGA AGA GAG GAG TTC ATG ATC AGT G-3' (8 nt de emparejamiento incorrecto 5'); 5'-CCC ATT TAG GTG ACA CTA TAG ATT TAC ATC GCG TTG AGT GTA GAA CGG TTG TAT AAA AGG TAC TCG TAG TAG GTT GTA TAG TGA AGA GAG GAG TTC ATG ATC AGT G-3' (4 nt de emparejamiento incorrecto de S). En las Figuras 13, 14, 15, 17A, 19 y 20A, la secuencia objetivo es 613 nt larga; 379 nt en las Figuras 16A-C, 17B y 20B; y 182 nt en la Figura 16D. Todos los siARN se desprotegen de acuerdo con el protocolo del fabricante (Dharmacon), S'-radiomarcado según sea apropiado, luego el gel purificado en 15% de un gel poliacrilamida desnaturalizado. Los oligonucleótidos 2'-O-metilo son de Dharmacon. Las hebras de siARN se hibrida a altas concentraciones y se diluyen serialmente en amortiguador de lisis (30 nM de HEPES pH 7.4, 100 mM de KOAc, y 2 mM de MgCl₂). Los geles se secan y se forman en imagen como se describe (Schwartz et al., 2003). Se analizan imágenes utilizando Image Gauge 4.1 (Fuji). Los índices iniciales se determinan mediante regresión lineal utilizando Excel X (Microsoft) o IgorPro 5.01 (Wavemetrics). La gráfica Kaleida 3.6.2 (Software Synergy) se utiliza para determinar KM y Ki mediante fijado global en las ecuaciones: $V = (V_{max} x S) / (KM + S)$ y $V = (V_{max} x Ki(app)) / (Ki(app) + I)$ -1, en donde V es velocidad, S es concentración de ARN objetivo, y I es la concentración del competidor de oligonucleótido 2'-O-metilo. El Ki se calcula al corregir Ki(app) mediante el KM y la concentración de sustrato, $Ki = Ki(app) / (1 + (S / KM) - 1)$.

C. Preparación de siARN

Se desprotegen ARN sintéticos (Dharmacon) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las hebras siARN se hibridan (Elbashir et al., 2001a) y se utiliza en una concentración final de 50 nM a menos que se note otra cosa. Las hebras únicas de siARN se fosforilan con quinasa polinucleótido (New England Biolabs) y 1 mM de ATP de acuerdo con las directrices del fabricante y se utiliza en una concentración final de 500 nM.

D. Preparación de ARN objetivo

Se transcriben ARN objetivos con Polimerasa de ARN t7, marcada con histidina, recombinante de productos PCR como se describe (Nykänen et al., 2001; Hutvågner y Zamore, 2002), excepto para mRNA *sod1* codificante, que se transcribe de una plantilla de plásmido (Crow et al., 1997) linearizada con Bam HI. Las plantillas PCR para los ARN objetivo *htt* codificante y anticodificante y *sod1* anticodificante se generan al amplificar 0.1 ng/ml (concentración final) de la plantilla de plásmido que codifica el cADN *htt* o *sod1* utilizando los siguientes pares cebadores: objetivo codificante *htt*, 5'-GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA CAG TAT GTC TCA GAC ATC-3' y 5'-UUCG AAG UAU UCC GCG UAC GU-3'; objetivo anticodificante *htt*, 5'-GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAC AAG CCT AAT TAG TGATGC-3' y 5'-GAA CAG TAT GTC TCA GAC ATC-3'; objetivo anticodificante *sod1*, 5'-GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TTT GTT AGC AGC CGG AT-3' y 5'-GGG AGA CCA CAA CGG TTT CCC-3'.

10 Captura de oligonucleótido 2'-O-metilo inmovilizado de RISC

El extremo 5' de la hebra siARN que se mide es 32 P-radiomarcada con PNK. Se inmoviliza 10 pmol de ARN 2'-OMetilo biotinilado en Dynabeads M280 (Dyna) mediante incubación en 10 ml de amortiguador de lisis que contiene 2mM de DTT durante 1 h en hielo con el equivalente de 50 ml de la suspensión de los glóbulos proporcionados por el fabricante. Los glóbulos luego se lavan para remover el oligonucleótido no vinculado. Se preincuba siARN de SO nM en una reacción de ARN estándar de 50 ml in vitro durante 15 min a 25°C. Luego, se agrega todo el oligonucleótido 2'-O-Metilo inmovilizado a la reacción y la incubación continúa durante 1 h a 25°C. Después de incubación, los glóbulos se lavan rápidamente tres veces con amortiguador de lisis que contiene 0.1 % (p/v) NP-40 y 2 mM de DTT seguido por un lavado con el mismo amortiguador sin NP-40. La radiactividad vinculada y de entrada se determina mediante conteo de centelleo (Beckman). El grupo funcional 5'-biotina se liga por medio un brazo espaciador de seis carbonos. Los oligonucleótidos 2'- O-metilo (IDT) son: 5'-biotina-ACA UUU CGA AGU AUU CCG CGU ACG UGA UGU U-3' (para capturar la hebra codificante siARN) 5'-biótico-CAU CAC GUA CGC GGA AUA CUU CGA AAU GUC C-3' (para capturar la hebra anticodificante).

Análisis mfold

Para modelar el extremo de un siARN, se omiten las siguientes secuencias de ARN 16 nt para mfold 3.1: (37°C, 1 M de NaCl): CGU ACU UUU GUA CGU G, UGU ACU UUU GUA CGU G, y UCG AAU UU UUC GAA A.

Procesamiento Pre-let-7

El ARN Pre-let-7 se incuba con Dicer humano, etiquetado con histidina, de terminal N de acuerdo con las directrices del fabricante (Gene therapy Systems) o en un embrión *Drosophila* estándar en reacción de ARNi in vitro como se describió previamente (Hutvågner et al., 2001; Hutvågner y Zamore, 2002).

30 Hibridación Northern

La hibridación Northern es esencialmente como se describe (Hutvågner et al., 2001). Se carga 50 mg de ARN total por línea. Las sondas de ARN 5' sintéticas radiomarcadas 32 P (Dharmacon) son: 5'-ACA AAU UCG GAU CUA CAG GGU-3' (para detectar miR-10) y 5'-AAA. CCU CUC UAG AAC CGA AUU U-3' (para detectar miR-10*). La cantidad de miR-10 o miR- 10* detectada se normaliza para la hibridación no específica de la sonda de rARN 5S. Se normaliza la hibridación de la sonda en una cantidad conocida de un control de ARN sintético miR-10 o miR-10* que produce esencialmente el mismo resultado.

Agotamiento de ATP e Inhibición de N-etil maleimida (NEM)

Las reacciones de ARNi utilizando el lisato de embrión *Drosophila* son como se describe (Haley et al., 2003). Para comparar condiciones de ATP 'menos' y 'más', las muestras se tratan con 10 mM de NEM (Pierce) durante 10 min a 4°C, luego el NEM se apaga con 11 mM de ditiotretol (DTT). Para el agotamiento de ATP (-ATP), se agregan 1 unidad de hexoquinasa y 20 mM (concentración final) de glucosa y la incubación continúa durante 30 min a 25°C. Para reacciones ATP 'más', 0.05 mg de ml-1 (concentración final) quinasa creatina y un décimo del volumen de H₂O sustituido para hexoquinasa y glucosa. La adición de quinasa creatina fresca después de tratamiento de NEM no rescata el defecto en el ensamble de RISC, pero no restaura el ATP en altos niveles (Nykänen et al., 2001). Se miden los niveles de ATP utilizando un equipo de ensayo ATP (Sigma) y un luminómetro PhL (Mediators Diagnostika).

REFERENCIAS

Abrahante, J. E., Daul, A. L., Li, M., Volk, M. L., Tennessen, J. M., Miller, E. A., y Rougvie, A. E. (2003). The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like Gene *lin-57/ hbl-1* Controls Developmental Time and Is Regulated by MicroRNAs. *Dev Cell* 4, 625-637.

- Amarzguioui, M., Holen, T., Babaie, E., y Prydz, H. (2003). Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res* 31, 589-595.
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., et al. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9, 277-279.
- 5 Amarzguioui, M., Holen, T., Babaie, E., and Prydz, H. (2003). Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res* 31, 589-595.
- Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Muller, U., and Filipowicz, W. (2001). Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14428-14433.
- 10 Boutla, A., Delidakis, C., Livadaras, I., Tsagris, M., and Tabler, M. (2001). Short 5'-phosphorylated double-stranded RNAs induce RNA interference in *Drosophila*. *Curr Biol* 11, 1776-1780.
- Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B., and Cohen, S. M. (2003). bantam Encodes a Developmentally Regulated microRNA that Controls Cell Proliferation and Regulates the Proapoptotic Gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 113, 25-36.
- 15 Bridge, A. J., Pebemard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A. L., and Iggo, R. (2003). Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet*.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- 20 Caudy, A. A., Myers, M., Hannon, G. J., and Hammond, S. M. (2002). Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev* 16, 2491-2496.
- Chelladurai, B., Li, H., Zhang, K., and Nicholson, A. W. (1993). Mutational analysis of a ribonuclease III processing signal. *Biochemistry* 32, 7549-7558.
- Chen, X. (2003). A MicroRNA as a Translational Repressor of APETALA2 in Arabidopsis Flower Development. *Science (Science Express)* 10.1126/science.1088060).
- 25 Chiu, Y.-L., and Rana, T. M. (2002). RNAi in Human Cells: Basic Structural and Functional Features of Small Interfering RNA. *Molecular Cell* 10, 549-561.
- Chiu, Y.L. & Rana, T.M. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA* 9,1034-1048 (2003).
- 30 Crow, J. P., Sampson, J. B., Zhuang, Y., Thompson, J. A., and Beckman, J. S. (1997). Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite. *J Neurochem* 69, 1936-1944.
- Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C., and Ullu, E. (2001). RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. *RNA* 7, 1522-1530.
- D.H. Mathews, J. S., M. Zuker & D.H. Turner (1999). Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure. *J Mol Biol* 288, 911-940.
- 35 Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T. H., and Baulcombe, D. C. (2001). SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *EMBO J* 20, 2069-2078.
- Ding, H. et al. Selective silencing by RNAi of a dominant allele that causes amyotrophic lateral sclerosis. *Aging Cell* 2, 209-217 (2003).
- Doench, J. G., Petersen, C. P., and Sharp, P. A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 17, 438-442.
- 40 Doench, J.G. & Sharp, P.A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18, 504-511 (2004).

- Doi, N., Zenno, S., Ueda, R., Ohki-Hamazaki, H., Ui-Tei, K., and Saigo, K. (2003). Short-Interfering-RNA-Mediated Gene Silenciamiento in Mammalian Cells Requires Dicer and eIF2C Translation Initiation Factors. *Curr Biol* 13, 41-46.
- 5 Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001 a). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 20, 6877-6888.
- Elbashir, S.M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498 (2001).
- 10 Enright, A. et al. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol.* 5, R1 (2003).
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C. C. (2001). Genes and Mechanisms Related to RNA Interference Regulate Expression of the Small Temporal RNAs that Control *C. elegans* Developmental Timing. *Cell* 106, 23-34.
- 15 Haley, B., Tang, G. & Zamore, P.D. In vitro analysis of RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Methods* 30, 330-336 (2003).
- Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silenciamiento in plants. *Science* 286, 950-952.
- 20 Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nucleamediadotes posttranscriptional gene silenciamiento in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- Hammond, S. M., Caudy, A. A., and Hannon, G. J. (2001). Post-trmscriptional gene silenciamiento by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2,110-119.
- Hannon, G.J. & Zamore, P.D. Small RNAs, Big Biology: and Biochemical Studies of RNA Interference. In *RNAi: A Guide To Gene Silenciamiento* (ed. Hannon, G.J.) 87-108 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 2003).
- 25 Holen, T., Amarzguoui, M., Babaie, E. & Prydz, H. Similar behaviour of single-strand and double-strand siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway. *Nucleic Acids Res* 31, 2401-2407 (2003).
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, É., Tuschl, T., and Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834-838.
- 30 Hutvagner, G., and Zamore, P. D. (2002). A MicroRNA in a Recambio múltiple RNAi Enzyme Complex. *Science* 297, 2056-2060.
- Hutvagner, G., Simard, M.J., Mello, C.C. & Zamore, P.D. Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biology* 2, 1-11 (2004).
- 35 Ishizuka, A., Siomi, M. C., and Siomi, H. (2002). A *Drosophila* fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev* 16, 2497-2508.
- Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., and Linsley, P. S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21, 635-637.
- 40 Johnston, R.J. & Hobert, O. A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 426, 845-849 (2003).
- Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A., and Carrington, J. C. (2003). P1/FiCPro, a Viral Suppressor of RNA Silenciamiento, Interferes with Arabidopsis Development and miRNA Function. *Dev Cell* 4, 205-217.

- Kennerdell, J. R., Yamaguchi, S., and Carthew, R W. (2002). RNAi is activated during *Drosophila* oocyte maturation in a manner dependent on aubergine and spindle-E. *Genes Dev* 16, 1884-1889.
- 5 Ketting, R. F., Fischer, S. E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J., and Plasterk, R. H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15, 2654-2659.
- Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S.D. Functional siRNAs and mRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216 (2003).
- Knight, S. W., and Bass, B. L. (2001). A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293, 2269-2271.
- 10 Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* 294, 853-858.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse. *Curr Biol* 12, 735-739.
- 15 Lagos-Quintana, M., Rauhut, R, Meyer, J., Borkhardt, A., and Tuschl, T. (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA* 9, 175-179.
- Lai, E.C. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 30, 363-364 (2002).
- Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., and Bartel, D. P. (2001). An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862.
- 20 Lee, R C., and Ambros, V. (2001). An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-864.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- 25 Lewis, B., Shih, I., Jones-Rhoades, M., Bartel, D. & Burge, C. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-798 (2003).
- Lim, L. P., Glasner, M. E., Yenta, S., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2003a). Vertebrate microRNA genes. *Science* 299, 1540.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Weinstein, E. G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M. W., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2003b). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 17, 991-1008.
- 30 Lin, S. Y., Johnson, S. M., Abraham, M., Vella, M. C., Pasquinelli, A., Gamberi, C., Gottlieb, E., and Slack, F. J. (2003). The *C. elegans* hunchback Homolog, *hbl-1*, Controls Temporal Lima, W.F. & Crooke, S.T. Binding affinity and specificity of *Escherichia coli* RNase H1: impact on the kinetics of catalysis of antisense oligonucleotide-RNA hybrids. *Biochemistry* 36, 390-398 (1997).
- 35 Llave, C., Kasschau, K. D., Rector, M. A., and Carrington, J. C. (2002a). Endogenous and Silenciamiento-Associated Small RNAs in Plants. *Plant Cell* 14, 1605-1619.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. (2002b). Cleavage of Scarecrow-Like mRNA Targets Directed by a Class of Arabidopsis miRNA. *Science* 297, 2053-2056.
- 40 Mallory, A. C., Reinhart, B. J., Bartel, D., Vance, V. B., and Bowman, L. H. (2002). A viral suppressor of RNA silenciamiento differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15228-15233.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., H, H. U., Luhrmann, R., and Tuschl, T. (2002). Single stranded antisense siRNA guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110, 563-574.
- Martinez, J. & Tuschl, T. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev*. Published online, April 22, 2004, 10.1101/gad.1187904 (2004).

- McManus, M. T., Petersen, C. P., Haines, B. B., Chen, J., and Sharp, P. A. (2002). Gene silencing using microRNA designed hairpins. *RNA* 8, 842-850.
- Meister, G., Landthaler, M., Dorsett, Y. & Tuschl, T. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA* 10, 544-550 (2004).
- 5 Myers, J. W., Jones, J. T., Meyer, T., and Ferrell, J. E. (2003). Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing. *Nat Biotechnol.*
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A. K., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of Ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 16, 720-728.
- 10 Nykänen, A., Haley, B., and Zamore, P. D. (2001). ATP Requirements and Small Interfering RNA Structure in the RNA Interference Pathway. *Cell* 107, 309-321.
- Olsen, P. H., and Ambros, V. (1999). The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 216, 671-680.
- 15 Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., and Conklin, D. S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16, 948-958.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., and Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer Homolog, and HEN1, a Novel Protein, Act in microRNA Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 12, 1484-1495.
- Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degan, B., Muller, P., et al. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86-89.
- 20 Paul, C. P., Good, P. D., Winer, I., and Engelke, D. R. (2002). Effective expression of ' small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* 20, 505-508. Pham, J.W., Pellino, J.L., Lee, Y.S., Carthew, R.W. & Sontheimer, E.J. A Dicer-2-dependent 80S complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* 117, 83-94 (2004).
- Phipps, K.M., Martinez, A., Lu, J., Heinz, B.A. & Zhao, G. Small interfering RNA molecules as potential anti-human rhinovirus agents: in vitro potency, specificity, and mechanism. *Antiviral Res* 61, 49-55 (2004).
- 25 Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Frendewey, D., Samuelsson, B., and Radmark, O. (2002). Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J* 21, 5864-5874. Raj ewsky, N. & Socci, N.D. Computational identification of microRNA targets. *Dev. Biol.* 267, 529-535 (2004).
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.
- 30 Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., and Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16, 1616-1626. Reynolds, A. et al. Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology* 22, 326-330 (2004).
- 35 Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B., and Bartel, D. P. (2002). Prediction of Plant MicroRNA Targets. *Cell* 110, 513-520.
- Ruvkun, G. (2001). Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 294, 797-799.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Haley, B., and Zamore, P. D. (2002). Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Molecular Cell* 10, 537-548.
- 40 Schwarz, D.S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115,199-208 (2003).
- Schwarz, D.S., Tomari, Y. & Zamore, P.D. The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease. *Curr. Biol.* 14, 787-791 (2004).
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H., and Fire, A. (2001). On the Role of RNA Amplification in dsRNA-Triggered Gene Silencing. *Cell* 107, 465-476.

- Silhavy, D., Molnar, A., Luciola, A., Szittyá, G., Homyik, C., Tavazza, M., and Burgyan, J. (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J* 21, 3070-3080.
- 5 Slack, F. J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H. R., and Ruvkun, G. (2000). The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell* 5, 659-669.
- Stark, A., Brennecke, J., Russel, R. & Cohen, S. Identification of *Drosophila* microRNAs targets. *PLoS Biology* 1, 1-13 (2003).
- Stryer, L. *Biochemistry*. (W. H. Freeman and Company, San Francisco; 1981).
- 10 Tabara, H., Yigit, E., Siomi, H., and Mello, C. C. (2002). The dsRNA Binding Protein RDE-4 Interacts with RDE-1, DCR-1, and a DexH-Box Helicase to Direct RNAi in *C. elegans*. *Cell* 109, 861-871.
- Tang, G., Reinhart, B. J., Bartel, D. P., and Zamore, P. D. (2003). A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 17, 49-63.
- 15 Tijsterman, M., Ketting, R. F., Okihara, K. L., Sijen, T., and Plasterk, R. H. (2002). RNA helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. elegans* by short antisense RNA. *Science* 295, 694-697.
- roman, Y. et al. RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant *armitage*. *Cell* 116, 831-841 (2004).
- Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P., and Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* 13, 3191-3197.
- 20 Vella, M., Choi, E., Lin, S., Reinert, K. & Slack, F. The *C. elegans* microRNA *let-7* binds to imperfect *let-7* complementary sites from the *lin-41* 3UTR. *Genes Dev.* 18, 132-137 (2004).
- Voet, D. & Voet, J.G. *Biochemistry*. (John Wiley & Sons, Hoboken, NJ; 2004).
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862.
- 25 Wu, H., Lima, W.F. & Crooke, S.T. Investigating the structure of human RNase H1 by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 276, 23547-23553. (2001).
- Wu-Scharf, D., Jeong, B., Zhang, C., and Cerutti, H. (2000). Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-Box RNA helicase. *Science* 290, 1159-1163.
- Xie, Z., Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. (2003). Negative Feedback Regulation of Dicer-Like in *Arabidopsis* by microRNA-Guided mRNA Degradation. *Curr Biol* 13, 784-789.
- 30 Xu, P., Vernooy, S. Y., Guo, M., and Hay, B. A. (2003). The *Drosophila* MicroRNA *Mir-14* Suppresses Cell Death and Is Required for Normal Fat Metabolism. *Curr Biol* 13, 790-795.
- Yu, J. Y., DeRuiter, S. L., and Turner, D. L. (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6047-6052.
- 35 Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.
- Zhang, H., Kolb, F. A., Brondani, V., Billy, E., and Filipowicz, W. (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J* 21, 5875-5885.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31, 1-10.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Massachusetts ZAMORE, Phillip D.

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA MEJORAR LA EFICACIA Y ESPECIFICIDAD DEL ARNi

<130> UMY-066PC

5 <150> 60/475331

<151> 2003-06-02

<150> 60/507928

<151> 2003-09-30

<150> 60/575268

10 <151> 2004-05-28

<160> 318

<170> FastSEQ para versión windows 4.0

<210> 1

<211> 40

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador sintético

<400> 1

20 cgctaatacg actcactata gcagttggcg ccgcgaacga 40

<210> 2

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> cebador sintético

<400> 2

gcgtaatacg actcactata gtcacatctc atctacctcc 40

<210> 3

30 <211> 106

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador sintético

5 <400> 3

```

cccatttagg tgacctata gatttacatc gcgttgagtg tagaacggtt gtataaaagg 60
ttgaggtagt aggttgata gtgaagagag gagttcatga tcagtg 106

```

<210> 4

<211> 106

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador sintético

<400> 4

```

cccatttagg tgacctata gatttacatc gcgttgagtg tagaacggtt gtataaaagg 60
ttgaggtagt aggttcatgc aggaagagag gagttcatga tcagtg 106

```

15 <210> 5

<211> 106

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> cebador sintético

<400> 5

```

cccatttagg tgacctata gatttacatc gcgttgagtg tagaacggtt gtataaaagg 60
ttgaggtagt aggtcaugc aggaagagag gagttcatga tcagtg 106

```

<210> 6

<211> 106

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador sintético

<400> 6

cccatttagg tgacctata gatttacatc gcgttgagtg tagaacggtt gtataaaagg 60
ttgaggtagt aggaacatgc aggaagagag gagttcatga tcagtg 106

<210> 7

<211> 106

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador sintético

<400> 7

10 **cccatttagg tgacctata gatttacatc gcgttgagtg tagaacggtt gtataaaagg 60**
tactccatct aggttgata gtgaagagag gagttcatga tcagtg 106

<210> 8

<211> 106

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> cebador sintético

<400> 8

cccatttagg tgacctata gatttacatc gcgttgagtg tagaacggtt gtataaaagg 60
tactcgtagt aggttgata gtgaagagag gagttcatga tcagtg 106

<210> 9

20 <211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

25 <400> 9

gcgtaatacg actcactata ggaacagtat gtctcagaca tc 42

<210> 10

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 10

5 uucgaaguau uccgcuacg u 21

<210> 11

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> construcción sintética

<400> 11

gcgtaatcg actcactata ggacaagcct aattagtgat gc 42

<210> 12

15 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

20 <400> 12

gaacagtatg tctcagacat c 21

<210> 13

<211> 41

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 13

gcgtaatcg actcactata gggcttggt agcagccgga t 41

30 <210> 14

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

5 <400> 14

gggagaccac aacggttcc c 21

<210> 15

<211> 31

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 15

acauuucgaa guauuccgcg uacgugaugu u 31

15 <210> 16

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> construcción sintética

<400> 16

caucacguac gcggauacu ucgaaauguc c 31

<210> 17

<211> 16

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 17

30 cguacuuuug uacgug 16

<210> 18

- <211> 16
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 5 <223> construcción sintética
- <400> 18
- uguacuuuug uacgug 16
- <210> 19
- <211> 15
- 10 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 19
- 15 ucgaauuuuu cgaaa 15
- <210> 20
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 20
- acaaauucgg aucuacaggg u 21
- <210> 21
- 25 <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- 30 <400> 21
- aaaccucucu agaaccgaau uu 22

<210> 22

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> construcción sintética

<400> 22

cgaggugaac aucacguacg cggaauacuu cgaaaugucc 40

<210> 23

10 <211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

15 <400> 23

ggacauuucg aaguauuccg cguacgugau guucaccucg 40

<210> 24

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 24

cguacgcgga auacuucgaa a 21

25 <210> 25

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> construcción sintética

<400> 25

	ucgaaguauu ccgcuacgu g	21
	<210> 26	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 26	
	cguacgcgga auacuucgaa a	21
10	<210> 27	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> construcción sintética	
	<400> 27	
	gugcaugcgc cuuauagaagc u	21
	<210> 28	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 28	
25	uguacgcgga auacuucgaa a	21
	<210> 29	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> construcción sintética	

- <400> 29
 ucgaaguauu ccgCGUACGU g 21
 <210> 30
 <211> 40
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 30
 10 cgaggugaac aucacguacg cGgAAUACUU CGAAAugucc 40
 <210> 31
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 31
 ggacAUUUCG aAGUauUCCG cGUACGUGAU GUcACCUCG 40
 <210> 32
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 25 <400> 32
 cacguacgCG GAUACUUCG a 21
 <210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>

- <223> construcción sintética
 <400> 33
 gaaguauucc gcguacguga u 21
 <210> 34
- 5 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
- 10 <400> 34
 uacguacgcg gaauacuucg a 21
 <210> 35
 <211> 21
 <212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 35
 gaaguauucc gcguacguaa u 21
- 20 <210> 36
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 25 <223> construcción sintética
 <400> 36
 uacguacgcg gaauacuucg a 21
 <210> 37
 <211> 21
- 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

	<220>		
	<223> construcción sintética		
	<400> 37		
	gaaguuucc gcguacguga u	21	
5	<210> 38		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
10	<223> construcción sintética		
	<400> 38		
	cacguacgcg gaauacuucg a	21	
	<210> 39		
	<211> 21		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> construcción sintética		
	<400> 39		
20	gaaguuucc gcguacguaa u	21	
	<210> 40		
	<211> 42		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
25	<220>		
	<223> construcción sintética		
	<400> 40		
	agagaggcau guuggagacu ugggcaaugu gacugcugac aa	42	
	<210> 41		
30	<211> 41		
	<212> ADN		

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 41

5 cuuugucagc agucacauug cccaagucuc caacaugccu c 41

<210> 42

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> construcción sintética

<400> 42

gagacuuggg caaugugac 19

<210> 43

15 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

20 <400> 43

gucacauugc ccaagucuc 19

<210> 44

<211> 19

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 44

gagacuuggg caaugugaa 19

30 <210> 45

<211> 19

- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- 5 <400> 45
 - gucacauugc ccaagucuc 19
 - <210> 46
 - <211> 19
 - <212> ADN
- 10 <213> Secuencia Artificial
 - <220>
 - <223> construcción sintética
 - <400> 46
 - gagacuuggg caaugugac 19
- 15 <210> 47
 - <211> 19
 - <212> ADN
 - <213> Secuencia Artificial
 - <220>
- 20 <223> construcción sintética
 - <400> 47
 - uucacauugc ccaagucuc 19
 - <210> 48
 - <211> 19
- 25 <212> ADN
 - <213> Secuencia Artificial
 - <220>
 - <223> construcción sintética
 - <400> 48
- 30 gagacuuggg caaugugaa 19
 - <210> 49

- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 5 <223> construcción sintética
- <400> 49
- uucacauugc ccaagucuc 19
- <210> 50
- <211> 19
- 10 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 50
- 15 gagacuuggg caaugugac 19
- <210> 51
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 51
- gucacauugc ccaagucua 19
- <210> 52
- 25 <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- 30 <400> 52
- uagacuuggg caaugugac 19

- <210> 53
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 53
- gucacauugc ccaagucuc 19
- <210> 54
- 10 <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- 15 <400> 54
- uagacuuggg caaugugac 19
- <210> 55
- <211> 19
- <212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 55
- aucugaaccc guuacacug 19
- 25 <210> 56
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 30 <223> construcción sintética
- <400> 56

	gucacauugc ccaagucuc	19
	<210> 57	
	<211> 19	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 57	
	uucacauugc ccaagucuc	19
10	<210> 58	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> construcción sintética	
	<400> 58	
	gagacuuggg caaugugaa	19
	<210> 59	
	<211> 19	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 59	
25	gagacuuggg caaugugac	19
	<210> 60	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> construcción sintética	

	<400> 60	
	agacuugggc aaugugac	18
	<210> 61	
	<211> 19	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 61	
10	gucacauugc ccaagucuc	19
	<210> 62	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 62	
	gagacuuggg caaugugac	19
	<210> 63	
20	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
25	<400> 63	
	ucacauugcc caagucuc	18
	<210> 64	
	<211> 18	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

	<223> construcción sintética	
	<400> 64	
	agacuugggc aaugugac	18
	<210> 65	
5	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
10	<400> 65	
	ucacauugcc caagucuc	18
	<210> 66	
	<211> 18	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 66	
	agacuugggc aaugugac	18
20	<210> 67	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> construcción sintética	
	<400> 67	
	cucugaaccc guuacacu	18
	<210> 68	
	<211> 33	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

<220>

<223> construcción sintética

<400> 68

ggcaauuga gguaguaggu uguaugaagu uau 33

5 <210> 69

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> construcción sintética

<400> 69

acucacuaua caaugugcua gcuuucuuug cu 32

<210> 70

<211> 21

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 70

20 ugagguagua gguuguauag u 21

<210> 71

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> construcción sintética

<400> 71

uauacaaugu gcuagcuuuc uu 22

<210> 72

30 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 72
 5 ccaugcuucc uugcaucaa ua 22
 <210> 73
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 73
 uggaauguaa agaaguaugg ag 22
 <210> 74
 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 20 <400> 74
 ucucaaagug guugugaaau g 21
 <210> 75
 <211> 23
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 75
 uaucacagcc agcuuugaug agc 23
 30 <210> 76
 <211> 22

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
5	<400> 76	
	cucaucaagu gguugugaua ug	22
	<210> 77	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 77	
	uacacagcc agcuuugaug agc	23
15	<210> 78	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> construcción sintética	
	<400> 78	
	ucuucaaagu ggcagugaca ug	22
	<210> 79	
	<211> 23	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 79	
30	uacacagcc agcuuugagg agc	23
	<210> 80	

- <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 5 <223> construcción sintética
- <400> 80
- ucuucaaagu gguugugaaa ug 22
- <210> 81
- <211> 23
- 10 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 81
- 15 uaucacagcc agcuugagg agc 23
- <210> 82
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 82
- ggaugcaucu ugugaguua ug 22
- <210> 83
- 25 <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- 30 <400> 83
- ucacugggca aagugugucu ca 22

<210> 84

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> construcción sintética

<400> 84

cuuuggucgu ccagccuuag gu 22

<210> 85

10 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

15 <400> 85

auaaagcuag acaaccuuug a 21

<210> 86

<211> 23

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 86

aaaggaacga ucguugugau aug 23

25 <210> 87

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> construcción sintética

<400> 87

	uaucaagug auuuuccuu au	22
	<210> 88	
	<211> 22	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 88	
	agggauagu ugcugugcug ua	22
10	<210> 89	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> construcción sintética	
	<400> 89	
	uaucaagug gcuguuuuu uu	22
	<210> 90	
	<211> 23	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 90	
25	aggaacuuc ugcugcugau aua	23
	<210> 91	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> construcción sintética	

	<400> 91	
	uaucaacagug gcuguucuuu uu	22
	<210> 92	
	<211> 23	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 92	
10	aggaacggu ugcugaugau gua	23
	<210> 93	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 93	
	uaucaacagug gcuguucuuu uu	22
	<210> 94	
20	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
25	<400> 94	
	uggaagacua gugauuuugu ugu	23
	<210> 95	
	<211> 26	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

- <223> construcción sintética
 <400> 95
 uaacaauaaa ucccuugucu ucuuac 26
 <210> 96
- 5 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
- 10 <400> 96
 caucuuaaccg ggcagcauua ga 22
 <210> 97
 <211> 23
 <212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 97
 uaaauacuguc agguaaagau guc 23
- 20 <210> 98
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 25 <223> construcción sintética
 <400> 98
 ucuuugguua ucuagcugua uga 23
 <210> 99
 <211> 23
- 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 99	
	auaaagcuag cuuaccgaag uua	23
5	<210> 100	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> construcción sintética	
	<400> 100	
	accuguaga uccgaauug u	21
	<210> 101	
	<211> 23	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 101	
20	auaaagcuag cuuaccgaag uua	23
	<210> 102	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 102	
	aagaacuuuc ucugugacc g	21
	<210> 103	
30	<211> 21	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 103	
5	caucacaguc ugaguucuug c	21
	<210> 104	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 104	
	ugaguauuac aucagguacu ggu	23
	<210> 105	
15	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
20	<400> 105	
	caguacuuau gucauacuac gc	22
	<210> 106	
	<211> 23	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 106	
	uccucaaagg guugugaaau guc	23
30	<210> 107	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
5	<400> 107	
	auaucacagc cauuuugaug agu	23
	<210> 108	
	<211> 25	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 108	
	ucguuaaaau guuugugaac uuau	25
15	<210> 109	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> construcción sintética	
	<400> 109	
	uauacagcc auuuugacga gu	22
	<210> 110	
	<211> 22	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 110	
30	gcgucaaaa u gacugugagc ua	22
	<210> 111	

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> construcción sintética

<400> 111

uaucaacagcc auuuugacga gu 22

<210> 112

<211> 21

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 112

15 ggagcgagac ggggacucac u 21

<210> 113

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> construcción sintética

<400> 113

ucagucuuuu ucucucuccu a 21

<210> 114

25 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

30 <400> 114

guauccacug uaggccuaua ug 22

<210> 115
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 115
 uaaggcacgc ggugaaugcc a 21
 <210> 116
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 15 <400> 116
 uccugagac ccuaacuugu ga 22
 <210> 117
 <211> 22
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 117
 acaaguuug aucuccgua uu 22
 25 <210> 118
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> construcción sintética
 <400> 118

	agcugguuga caucggguca gau	23
	<210> 119	
	<211> 22	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 119	
	uugguccccu ucaaccagcu gu	22
10	<210> 120	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> construcción sintética	
	<400> 120	
	cccuaucau ucucugccc cg	22
	<210> 121	
	<211> 23	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 121	
25	uggacggaga acugauaagg gcu	23
	<210> 122	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> construcción sintética	

<400> 122

guuuucgauu ugguuugacu 20

<210> 123

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 123

10 ugagaucauu uugaaagcug 20

<210> 124

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> construcción sintética

<400> 124

agagaggcau guuggagacu ugggcaaugu gacugcugac aa 42

<210> 125

20 <211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

25 <400> 125

cuuugucagc agucacauug cccaagucuc caacaugccu c 41

<210> 126

<211> 19

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

- <223> construcción sintética
 <400> 126
 uggagacuug ggcaaugug 19
 <210> 127
- 5 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
- 10 <400> 127
 cacauugccc aagucucca 19
 <210> 128
 <211> 19
 <212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 128
 uggagacuug ggcaaugug 19
- 20 <210> 129
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 25 <223> construcción sintética
 <400> 129
 uacauugccc aagucucca 19
 <210> 130
 <211> 23
- 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 130
- uggagacuug ggcaaugugd tdt 23
- 5 <210> 131
- <211> 23
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> construcción sintética
- <400> 131
- cacauugccc aagucuccad tdt 23
- <210> 132
- <211> 23
- 15 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 132
- 20 uacauugccc aagucuccad tdt 23
- <210> 133
- <211> 40
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 133
- ugcagcugau caucgaugug cugaccuga ggaacaguuc 40
- <210> 134
- 30 <211> 40
- <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 134

5 gaacuguucc ucagggucag cacaucgaug aucagcugca 40

<210> 135

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> construcción sintética

<400> 135

ugugcugacc cugaggaaca g 21

<210> 136

15 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

20 <400> 136

guuccucagg gucagcaca c 21

<210> 137

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 137

ugugcugacc cugaggaaaa g 21

30 <210> 138

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

5 <400> 138

uuuccucagg gucagcacau c 21

<210> 139

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 139

ugugcugacc cugaggaaaa g 21

15 <210> 140

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> construcción sintética

<400> 140

guuccucagg gucagcacau c 21

<210> 141

<211> 5

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 141 5

30 ccugu 5

<210> 142

<211> 7

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> construcción sintética

<400> 142 7

ggacaug 7

<210> 143

<211> 5

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 143

15 guucc 5

<210> 144

<211> 7

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> construcción sintética

<400> 144

ggaacac 7

<210> 145

25 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

30 <400> 145

ccuacgcgga auacuucgaa a

21

<210> 146

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> construcción sintética

<400> 146

ucgaaguauu ccgcuacu c 21

<210> 147

10 <211> 4

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

15 <400> 147

cgua 4

<210> 148

<211> 6

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 148

uacgug 6

25 <210> 149

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> construcción sintética

<400> 149

- ucuacgcgga auacuucgaa a 21
 <210> 150
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 150
- ucgaaguauu ccgcguacgu g 21
 10 <210> 151
 <211> 4
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 15 <223> construcción sintética
 <400> 151
 ugua 4
 <210> 152
 <211> 6
- 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 152
- 25 uacgug 6
 <210> 153
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
 <223> construcción sintética

- <400> 153
 cguacgcgga auacuuccaa a 21
 <210> 154
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 154
 10 uccaaguauu ccgcguacgu g 21
 <210> 155
 <211> 4
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 155
 ucga 4
 <210> 156
 20 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 25 <400> 156
 ucgaaa 6
 <210> 157
 <211> 19
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>

- <223> construcción sintética
 <400> 157
 gagaguuggg caaugagac 19
 <210> 158
 5 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 10 <400> 158
 gucacauugc ccaagucuc 19
 <210> 159
 <211> 19
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 159
 gagacuuggg caaugaac 19
 20 <210> 160
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> construcción sintética
 <400> 160
 gucacauugc ccaagucuc 19
 <210> 161
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 161
- gagacuuggg caauguguc 19
- 5 <210> 162
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> construcción sintética
- <400> 162
- gucacauugc ccaagucuc 19
- <210> 163
- <211> 19
- 15 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 163
- 20 gagacuuggg caaugugac 19
- <210> 164
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 164
- gucacauugc ccaagacuc 19
- <210> 165
- 30 <211> 19
- <212> ADN

- <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> construcción sintética
<400> 165
- 5 gagacuuggg caaugugac 19
<210> 166
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
<223> construcción sintética
<400> 166
gucacauugc ccaaguguc 19
<210> 167
- 15 <211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> construcción sintética
- 20 <400> 167
gagacuuggg caaugugac 19
<210> 168
<211> 19
<212> ADN
- 25 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> construcción sintética
<400> 168
gucacauugc ccaagucac 19
- 30 <210> 169
<211> 19

- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- 5 <400> 169
- gagacuuggg caauguggc 19
- <210> 170
- <211> 19
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 170
- gucacauugc ccaagucuc 19
- 15 <210> 171
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 20 <223> construcción sintética
- <400> 171
- gagacuuggg caaugugac 19
- <210> 172
- <211> 19
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 172
- 30 gucacauugc ccaagucac 19
- <210> 173

- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 5 <223> construcción sintética
- <400> 173
- gagacuuggg caauguggc 19
- <210> 174
- <211> 19
- 10 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 174
- 15 gucacauugc ccaagucuc 19
- <210> 175
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 175
- gagacuuggg caaugugac 19
- <210> 176
- 25 <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- 30 <400> 176
- guuacauugc ccaagucuc 19

<210> 177

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> construcción sintética

<400> 177

gagacuuggg caauguggc 19

<210> 178

10 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

15 <400> 178

guuacauugc ccaagucuc 19

<210> 179

<211> 27

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 179

uucacuauc aaccuacuac cucaacc 27

25 <210> 180

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> construcción sintética

<400> 180

	ugagguagua gguuguauag u	21
	<210> 181	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 181	
	uauaacaaccu acuaccucau u	21
10	<210> 182	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> construcción sintética	
	<400> 182	
	uucacuaauac aaccuacuac cucaacc	27
	<210> 183	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 183	
25	ugagguagua gguuguauag g	21
	<210> 184	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> construcción sintética	

	<400> 184	
	uaaacaaccu acuaccucau u	21
	<210> 185	
	<211> 27	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 185	
10	uucacuaaac aaccuacuac cucaacc	27
	<210> 186	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 186	
	ugagguagua gguuguauaa g	21
	<210> 187	
20	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
25	<400> 187	
	uaaacaaccu acuaccuccu u	21
	<210> 188	
	<211> 27	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

- <223> construcción sintética
- <400> 188
- uucacuaauac aaccuacuac cucaacc 27
- <210> 189
- 5 <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- 10 <400> 189
- ugagguagua gguuguauca g 21
- <210> 190
- <211> 21
- <212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 190
- gauacaaccu acuaccuccu u 21
- 20 <210> 191
- <211> 27
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 25 <223> construcción sintética
- <400> 191
- uucacuaauac aaccuacuac cucaacc 27
- <210> 192
- <211> 21
- 30 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 192
- ugagguagua gguuguagca g 21
- 5 <210> 193
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> construcción sintética
- <400> 193
- gcuacaaccu acuaccuccu u 21
- <210> 194
- <211> 21
- 15 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 194
- 20 ugagguagua gguuguauag u 21
- <210> 195
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 195
- uauacaaccu acuaccucau u 21
- <210> 196
- 30 <211> 27
- <212> ADN

- <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 196
- 5 uucacuaiac aaccuacuac cucaacc 27
 <210> 197
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 197
 ugagguagua gguuguauag u 21
 <210> 198
- 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
- 20 <400> 198
 uauacaaccu acuaccuau u 21
 <210> 199
 <211> 27
 <212> ADN
- 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 199
 uucacuaiac aaccuacuac cucaacc 27
- 30 <210> 200
 <211> 21

- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- 5 <400> 200
ugagguagua gguuguauag g 21
- <210> 201
- <211> 21
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 201
uauacaaccu acuaccuau u 21
- 15 <210> 202
- <211> 27
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 20 <223> construcción sintética
- <400> 202
uucacuaauac aaccuacuac cucaacc 27
- <210> 203
- <211> 21
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 203
- 30 ugagguagua gguuguauaa g 21
- <210> 204

- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 5 <223> construcción sintética
- <400> 204
- uauacaaccu acuaccuccu u 21
- <210> 205
- <211> 27
- 10 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 205
- 15 uucacauac aaccuacuac cucaacc 27
- <210> 206
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 206
- ugagguagua gguuguauca g 21
- <210> 207
- 25 <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- 30 <400> 207
- gauacaaccu acuaccuccu u 21

<210> 208

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> construcción sintética

<400> 208

uucacuaauac aaccuacuac cucaacc 27

<210> 209

10 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

15 <400> 209

ugagguagua gguuguagca g 21

<210> 210

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 210

gcuacaaccu acuaccuccu u 21

25 <210> 211

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> construcción sintética

<400> 211

	uucacuaauac aaccuacuac cucaacc	27
	<210> 212	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 212	
	ugagguagua gguuguugca g	21
10	<210> 213	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> construcción sintética	
	<400> 213	
	gcaacaaccu acuaccuccu u	21
	<210> 214	
	<211> 27	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 214	
25	uucacuaauac aaccuacuac cucaacc	27
	<210> 215	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> construcción sintética	

	<400> 215 21	
	ugagguagua gguugaugca g	21
	<210> 216	
	<211> 21	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 216	
10	gcaucaaccu acuaccuccu u	21
	<210> 217	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 217	
	uucacuauc aaccuacuac cucaacc	27
	<210> 218	
20	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
25	<400> 218	
	ugagguagua gguacaugca g	21
	<210> 219	
	<211> 21	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

- <223> construcción sintética
- <400> 219
- gcaugaaccu acuaccuccu u 21
- <210> 220
- 5 <211> 27
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- 10 <400> 220
- uucacuaauac aaccuacuac cucaacc 27
- <210> 221
- <211> 21
- <212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 221
- ugagguagua gcaacaugca g 21
- 20 <210> 222
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 25 <223> construcción sintética
- <400> 222
- gcauguuccu acuaccuccu u 21
- <210> 223
- <211> 27
- 30 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 223
- uucacuauc aaccuacuac cucaacc 27
- 5 <210> 224
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> construcción sintética
- <400> 224
- agagguagua gguuguauag u 21
- <210> 225
- <211> 21
- 15 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 225
- 20 uauacaaccu acuaccuccu u 21
- <210> 226
- <211> 27
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 226
- uucacuauc aaccuacuac cucaacc 27
- <210> 227
- 30 <211> 21
- <212> ADN

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 227	
5	acugguagua gguuguauag u	21
	<210> 228	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 228	
	uauacaaccu acuaccagcu u	21
	<210> 229	
15	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
20	<400> 229	
	uucacuauc aaccuacuac cucaacc	27
	<210> 230	
	<211> 21	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 230	
	acuccuagua gguuguauag u	21
30	<210> 231	
	<211> 21	

- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- 5 <400> 231
- uauacaaccu acuaggagcu u 21
- <210> 232
- <211> 27
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 232
- uucacuaauac aaccuacuac cucaacc 27
- 15 <210> 233
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 20 <223> construcción sintética
- <400> 233
- acuccaagua gguuguauag u 21
- <210> 234
- <211> 21
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 234
- 30 uauacaaccu acuuggagcu u 21
- <210> 235

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> construcción sintética

<400> 235

uucacuauc aaccuacuac cucaacc 27

<210> 236

<211> 21

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 236

15 acuccaugua gguuguauag u 21

<210> 237

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> construcción sintética

<400> 237

uauacaaccu acauggagcu u 21

<210> 238

25 <211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

30 <400> 238

uucacuauc aaccuacuac cucaacc 27

<210> 239

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> construcción sintética

<400> 239

acuccaucua gguuguauag u 21

<210> 240

10 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

15 <400> 240

uauacaaccu agauggagcu u 21

<210> 241

<211> 27

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 241

uuccugaug uaccuacuac cucaacc 27

25 <210> 242

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> construcción sintética

<400> 242

	ugagguagua gguuguauag u	21
	<210> 243	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 243	
	uauacaaccu acuaccuccu u	21
10	<210> 244	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> construcción sintética	
	<400> 244	
	uucacuauc aaccuagaug gaguacc	27
	<210> 245	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 245	
25	ugagguagua gguuguauag u	21
	<210> 246	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> construcción sintética	

	<400> 246	
	uaaacaaccu acuaccuccu u	21
	<210> 247	
	<211> 27	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 247	
10	uucacuauc aaccuagaug gaguacc	27
	<210> 248	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 248	
	acuccaucua gguuguauag u	21
	<210> 249	
20	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
25	<400> 249	
	uaaacaaccu agauggagcu u	21
	<210> 250	
	<211> 27	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

- <223> construcción sintética
 <400> 250
 uuccugcaug aaccuacuac cucaacc 27
 <210> 251
- 5 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
- 10 <400> 251
 ugagguagua gguuguauag u 21
 <210> 252
 <211> 21
 <212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 252
 uauacaaccu acuaccuccu u 21
- 20 <210> 253
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 25 <223> construcción sintética
 <400> 253
 uuccugcaug aaccuacuac cucaacc 27
 <210> 254
 <211> 21
- 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 254
- agagguagua gguuguauag u 21
- 5 <210> 255
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> construcción sintética
- <400> 255
- uauacaaccu acuaccuccu u 21
- <210> 256
- <211> 27
- 15 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 256
- 20 uuccugcaug aaccuacuac cugaacc 27
- <210> 257
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 257
- agagguagua gguuguauag u 21
- <210> 258
- 30 <211> 21
- <212> ADN

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 258	
5	uauacaaccu acuaccuccu u	21
	<210> 259	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 259	
	uuccugcaug aaccuacuac cucaacc	27
	<210> 260	
15	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
20	<400> 260	
	acugguagua gguuguauag u	21
	<210> 261	
	<211> 21	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 261	
	uauacaaccu acuaccagcu u	21
30	<210> 262	
	<211> 27	

- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- 5 <400> 262
- uuccugcaug aaccuacuac cucaacc 27
- <210> 263
- <211> 21
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 263
- acucguagua gguuguauag u 21
- 15 <210> 264
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 20 <223> construcción sintética
- <400> 264
- uauacaaccu acuaccagcu u 21
- <210> 265
- <211> 27
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 265
- 30 uuccugcaug uaccuacuac cucaacc 27
- <210> 266

- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 5 <223> construcción sintética
- <400> 266
- ugagguagua gguuguauag u 21
- <210> 267
- <211> 21
- 10 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 267
- 15 uauacaaccu acuaccuccu u 21
- <210> 268
- <211> 27
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 268
- uuccugcaug uaccuacuac cucaacc 27
- <210> 269
- 25 <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- 30 <400> 269
- agagguagua gguuguauag u 21

<210> 270

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> construcción sintética

<400> 270

uauacaaccu acuaccuccu u 21

<210> 271

10 <211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

15 <400> 271

uuccugcaug uaccuacuac cugaacc 27

<210> 272

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 272

agagguagua gguuguauag u 21

25 <210> 273

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> construcción sintética

<400> 273

	uauacaaccu acuaccuccu u	21
	<210> 274	
	<211> 27	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 274	
	uuccugcaug uaccuacuac cucaacc	27
10	<210> 275	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> construcción sintética	
	<400> 275	
	acugguagua gguuguauag u	21
	<210> 276	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 276	
25	uauacaaccu acuaccagcu u	21
	<210> 277	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> construcción sintética	

- <400> 277
uuccugcaug uaccuacuac cucaacc 27
- <210> 278
- <211> 21
- 5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> construcción sintética
<400> 278
- 10 acucguagua gguuguauag u 21
<210> 279
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 15 <220>
<223> construcción sintética
<400> 279
uauacaaccu acuaccagcu u 21
<210> 280
- 20 <211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> construcción sintética
- 25 <400> 280
uuccugcaug uaccuacuac cucaacc 27
<210> 281
<211> 21
<212> ADN
- 30 <213> Secuencia Artificial
<220>

- <223> construcción sintética
 <400> 281
 ugagguagua gguuguauag u 21
 <210> 282
- 5 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
- 10 <400> 282
 uauacaaccu acuaccuccu u 21
 <210> 283
 <211> 27
 <212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 283
 uuccugcaug uuccuacuac cucaacc 27
- 20 <210> 284
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 25 <223> construcción sintética
 <400> 284
 agagguagua gguuguauag u 21
 <210> 285
 <211> 21
- 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 285
- uauacaaccu acuaccuccu u 21
- 5 <210> 286
- <211> 27
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> construcción sintética
- <400> 286
- uuccugcaug uuccuacuac cugaacc 27
- <210> 287
- <211> 21
- 15 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 287
- 20 agagguagua gguuguauag u 21
- <210> 288
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 288
- uauacaaccu acuaccuccu u 21
- <210> 289
- 30 <211> 27
- <212> ADN

- <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 289
- 5 uuccugcaug uuccuacuac cucaacc 27
 <210> 290
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 290
 acugguagua gguuguauag u 21
 <210> 291
- 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
- 20 <400> 291
 uauacaaccu acuaccagcu u 21
 <210> 292
 <211> 27
 <212> ADN
- 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 292
 uuccugcaug uuccuacuac cucaacc 27
- 30 <210> 293
 <211> 21

- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- 5 <400> 293
 acucguagua gguuguauag u 21
- <210> 294
- <211> 21
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 294
 uauacaaccu acuaccagcu u 21
- 15 <210> 295
- <211> 31
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 20 <223> construcción sintética
- <400> 295
 ucuucacuai acaaccuacu accucaaccu u 31
- <210> 296
- <211> 21
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 296
- 30 ugagguagua gguuguauag u 21
- <210> 297

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> construcción sintética

<400> 297

uauacaaccu aguaccucau u 21

<210> 298

<211> 31

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 298

15 ucuucacua u acaaccuacu accucaaccu u 31

<210> 299

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> construcción sintética

<400> 299

acucguagua gguuguauag u 21

<210> 300

25 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

30 <400> 300

uauacaaccu agauggagcu u 21

<210> 301

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> construcción sintética

<400> 301

ucuucacua u acaaccuacu accucaaccu u 31

<210> 302

10 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

15 <400> 302

acuccaucua gguuguauag u 21

<210> 303

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 303

uauacaaccu agauggagcu u 21

25 <210> 304

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> construcción sintética

<400> 304

- aauucacua u acaaccaaga accucaaccu u 31
 <210> 305
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 305
 ugagguagua gguuguauag u 21
 10 <210> 306
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> construcción sintética
 <400> 306
 uauacaaccu acuaccucau u 21
 <210> 307
 <211> 31
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 307
 25 ucuucacua u acauggaacu accucaaccu u 31
 <210> 308
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> construcción sintética

	<400> 308	
	ugagguagua gguuguauag u	21
	<210> 309	
	<211> 21	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 309	
10	uauacaaccu acuaccucau u	21
	<210> 310	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> construcción sintética	
	<400> 310	
	ucuucaacu acaaccuacu accucaaccu u	31
	<210> 311	
20	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción sintética	
25	<400> 311	
	ugagguagua gguuguauag u	21
	<210> 312	
	<211> 21	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

- <223> construcción sintética
- <400> 312
- uauacaaccu acuaccucau u 21
- <210> 313
- 5 <211> 31
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- 10 <400> 313
- ucuuccaacc aagaccuacu accucaaccu u 31
- <210> 314
- <211> 21
- <212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> construcción sintética
- <400> 314
- ugagguagua gguuguauag u 21
- 20 <210> 315
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 25 <223> construcción sintética
- <400> 315
- uauacaaccu acuaccucau u 21
- <210> 316
- <211> 31
- 30 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 316

ucuucacua u acaaccuacu accucaaccu u 31

5 <210> 317

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> construcción sintética

<400> 317

ugagguagua gguacaugca g 21

<210> 318

<211> 21

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 318

20 gcaugaaccu acuaccuccu u 21

REIVINDICACIONES

1. Un método para mejorar la capacidad de una hebra anticodificante de un agente ARNi para actuar como un hebra guía en mediar ARNi, que comprende disminuir la fuerza de los pares base entre el extremo 5' de la hebra anticodificante y el extremo 3' de la hebra codificante del dúplex cuando se compara con la fuerza del par base entre el extremo 3' de la hebra anticodificante y el extremo 5' de la hebra codificante, en donde el extremo 5' de las hebras codificantes y anticodificantes es los cinco nucleótidos en el terminal 5' de las hebras respectivas, y el extremo 3' de las hebras codificantes y anticodificantes es la región de cinco nucleótidos en el terminal 3' de las hebras respectivas que son complementarias con el extremo 5' de las hebras complementarias respectivas.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el agente ARNi es un dúplex siARN.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la resistencia de par base es menor debido a pocos pares base G:C entre el extremo 5' de la hebra anticodificante y el extremo 3' de la hebra codificante que entre el extremo 3' de la hebra anticodificante y el extremo 5' de la hebra codificante.
4. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base con emparejamiento incorrecto entre el extremo 5' de la hebra anticodificante y el extremo 3' de la hebra codificante.
5. El método de la reivindicación 4, en donde el par base con emparejamiento incorrecto se selecciona del grupo que consiste de G:A, C:A, C:U, G:G, A:A, C:C y U:U.
6. El método de la reivindicación 4, en donde el par base con emparejamiento incorrecto se selecciona del grupo que consiste de G:A, C:A, C:T, G:G, A:A, C:C y U:T.
7. El método de la reivindicación 1 ó 2, en donde la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base oscilante entre el extremo 5' de la hebra anticodificante y el extremo 3' de la hebra codificante.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el par base oscilante es G:U.
9. El método de la reivindicación 7, en donde el par base oscilante es G:T.
10. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la resistencia de par base es menor debido a:
 - (a) por lo menos un par base de con emparejamiento incorrecto entre el extremo 5' de la hebra anticodificante y el extremo 3' de la hebra codificante; y
 - (b) por lo menos un par base oscilante entre el extremo 5' de la hebra anticodificante y el extremo 3' de la hebra codificante.
11. El método de la reivindicación 10, en donde el par base de emparejamiento incorrecto se selecciona del grupo que consiste de G:A, C:A, C:U, G:G, A:A, C:C y U:U.
12. El método de la reivindicación 10, en donde el par base de emparejamiento incorrecto se selecciona del grupo que consiste de G:A, C:A, C:T, G:G, A:A, C:C y U:T.
13. El método de la reivindicación 10, en donde el par base oscilante es G:U.
14. El método de la reivindicación 10, en donde el par base oscilante es G:T.
15. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base que comprende un nucleótido raro.
16. El método de la reivindicación 10, que comprende adicionalmente por lo menos un nucleótido raro entre el extremo 5' de la hebra anticodificante y el extremo 3' de la hebra codificante.
17. El método de la reivindicación 15 o 16, en donde el nucleótido raro es inosina (I).
18. El método de la reivindicación 17, en donde el par base se selecciona del grupo que consiste de un I:A, I:U e I:C.

19. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base que comprende un nucleótido modificado.
20. El método de la reivindicación 10, que comprende adicionalmente por lo menos un nucleótido modificado entre el extremo 5' de la hebra anticodificante y el extremo 3' de la hebra codificante.
- 5 21. El método de la reivindicación 19, en donde el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste de 2-amino-G, 2-amino-A, 2,6-diamino-G, 2,6-diamino-A.
22. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el agente ARNi o dúplex siARN se sintetiza químicamente.
23. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el agente ARNi o dúplex siARN se sintetiza enzimáticamente.
- 10 24. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el agente ARNi o dúplex siARN se deriva de un precursor construido por ingeniería.
25. El uso in vitro de un agente ARNi o dúplex siARN como se define en cualquier reivindicación precedente en un método para mejorar silenciamiento de un mRNA objetivo, que comprende poner en contacto una célula que tiene una ruta de ARNi con el agente ARNi o dúplex siARN bajo condiciones tales que se mejora el silenciamiento.
- 15 26. Un agente ARNi o dúplex siARN como se define en cualquier reivindicación precedente para uso en un método para mejorar silenciamiento de un mRNA objetivo en un sujeto en donde una composición farmacéutica que comprende el agente ARNi o dúplex siARN se administra a dicho sujeto de tal manera que the silenciamiento se mejora.
- 20 27. Un método in vitro para reducir silenciamiento de mRNA objetivo inadvertido mediante un agente dsARNi, el agente dsARNi que comprende una hebra codificante y una hebra anticodificante comprenden:
- (a) detectar un grado significativo de complementariedad entre la hebra codificante y el objetivo inadvertido; y
- (b) mejorar la resistencia de par base entre el extremo 5' de la hebra codificante y el extremo 3' de la hebra anticodificante con relación a la resistencia de par base entre el extremo 3' de la hebra codificante y el extremo 5' de la hebra anticodificante; de tal manera que se reduce silenciamiento del mRNA objetivo inadvertido; en donde el
- 25 extremo 5' de las hebras codificantes y anticodificantes es los cinco nucleótidos en el terminal 5' de las hebras respectivas, y el extremo 3' de las hebras codificantes y anticodificantes es la región de cinco nucleótidos en el terminal 3' de las hebras respectivas que es complementario con el extremo 5' de las hebras complementarias respectivas.
- 30 28. El método de la reivindicación 27, en donde silenciamiento del mRNA objetivo inadvertido se reduce con relación al silenciamiento de un mRNA objetivo deseado.
- 35 29. Un dúplex siARN que comprende una hebra codificante y una hebra anticodificante, en donde la resistencia de par base entre el extremo 5' de la hebra anticodificante (AS 5') y el extremo 3' de la hebra codificante (S 3') es menor que la resistencia de par base entre el extremo 3' de la hebra anticodificante (AS 3') y el extremo 5' de la hebra codificante (S 5'), de tal manera que la hebra anticodificante guía preferiblemente la división de un mRNA objetivo, en donde la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base de emparejamiento incorrecto entre el AS 5' y el S 3', o la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base oscilante entre el AS 5' y el S 3', o la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base que comprende un nucleótido raro, o la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base que comprende un
- 40 nucleótido modificado, y en donde el extremo 5' de las hebras codificantes y anticodificantes es los cinco nucleótidos en el terminal 5' de las hebras respectivas, y el extremo 3' de las hebras codificantes y anticodificantes es la región de cinco nucleótidos en el terminal 3' de las hebras respectivas que es complementario con el extremo 5' de las hebras complementarias respectivas.
30. El dúplex siARN de la reivindicación 29, en donde la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base de emparejamiento incorrecto entre el AS 5' y el S 3'.
- 45 31. El dúplex siARN de la reivindicación 30, en donde el par base de emparejamiento incorrecto se selecciona del grupo que consiste de G:A, C: A, C:U, G:G, A:A, C:C y U:U.
32. El dúplex siARN de la reivindicación 30, en donde el par base de emparejamiento incorrecto se selecciona del grupo que consiste de G:A, C: A, C:T, G:G, A:A, C:C y U:T.

33. El dúplex siARN de la reivindicación 29, en donde la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base oscilante entre el AS 5' y el S 3'.
34. El dúplex siARN de la reivindicación 30, en donde el par base oscilante es G:U.
35. El dúplex siARN de la reivindicación 30, en donde el par base oscilante es G:T.
- 5 36. El dúplex siARN de la reivindicación 29, en donde la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base que comprende un nucleótido raro.
37. El dúplex siARN de la reivindicación 36, en donde el nucleótido raro es inosina (I).
38. El dúplex siARN de la reivindicación 37, en donde el par base se selecciona del grupo que consiste de un I:A, I:U e I:C.
- 10 39. El dúplex siARN de la reivindicación 29, en donde la resistencia de par base es menor debido a por lo menos un par base que comprende un nucleótido modificado.
40. El dúplex siARN de la reivindicación 39, en donde el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste de 2-amino- G, 2-amino-A, 2,6-diamino-G, y 2,6-diamino-A.
- 15 41. Una composición que comprende el dúplex siARN de una cualquiera de las reivindicaciones 29-40 formuladas para facilitar la entrada del agente ARNi del dúplex siARN en una célula.
42. Una composición farmacéutica que comprende el dúplex siARN de una cualquiera de las reivindicaciones 29-40.
43. Un pre-miARN construido por ingeniería que comprende el dúplex siARN de una cualquiera de las reivindicaciones 29-40.
- 20 44. Un vector que codifica el pre-miARN de la reivindicación 43.
45. Un pri-miARN que comprende el pre-miARN de la reivindicación 44.
46. Un vector que codifica el pri-miARN de la reivindicación 45.
47. Un ARN de horquilla pequeña (shARN) que comprende secuencias de nucleótido idénticas a la hebra codificante y anticodificante del dúplex siARN de una cualquiera de las reivindicaciones 29-40.
- 25 48. El shARN de la reivindicación 47, en donde la secuencia de nucleótido idéntica a la hebra codificante está en la dirección 5' de la secuencia de nucleótido idéntica a la hebra anticodificante.
49. El shARN de la reivindicación 47, en donde la secuencia de nucleótido idéntica a la hebra anticodificante está en la dirección 5' de la secuencia de nucleótido idéntica a la hebra codificante.
50. Un vector que codifica el shARN de una cualquiera de las reivindicaciones 47-49.
- 30 51. Una célula que comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 44, 46 o 50.
52. La célula de la reivindicación 51, que es una célula de mamífero.
53. La célula de la reivindicación 51, que es una célula humana.
54. Un transgen que codifica el shARN de una cualquiera de las reivindicaciones 47-49.

A Objetivo codificante *Pp luc*: 5' - cgaggugaacaucacquacgcggaauacuucgaaugucc - 3'

Objetivo anticodificante *Pp luc*: 3' - gcuccacuuguagugcaugcgccuuaugaagcuuacagg - 5'

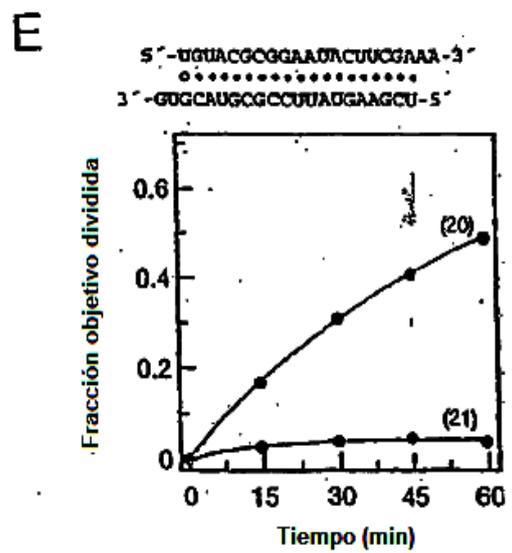
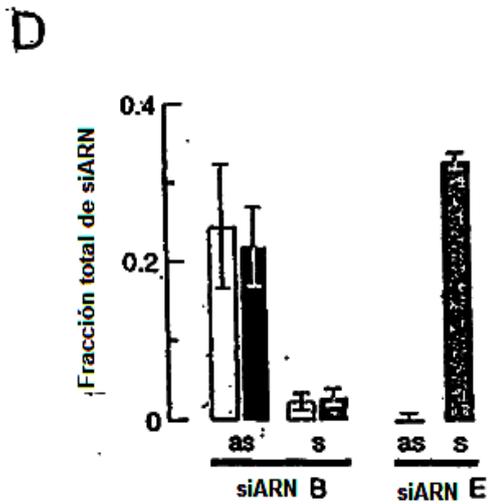
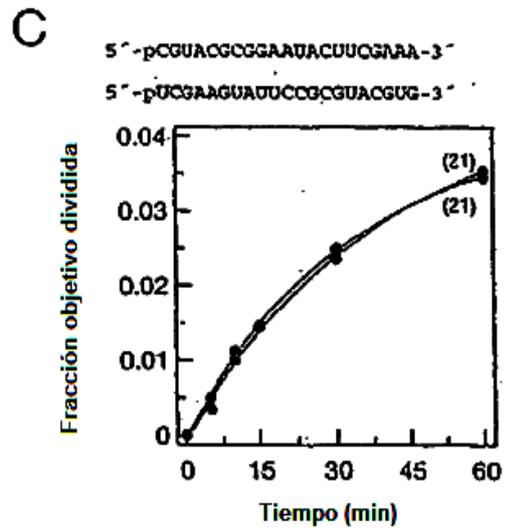
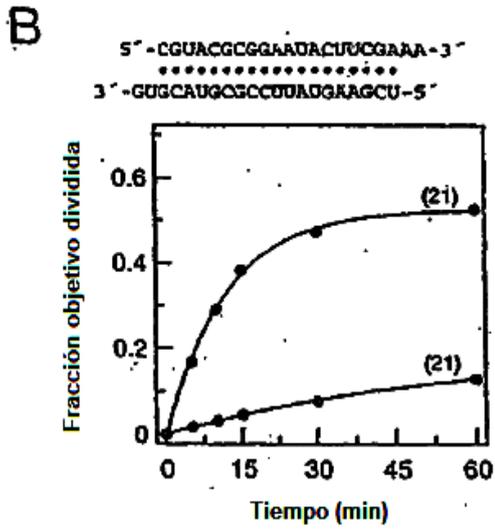


FIGURA 2

A
 objetivo codificante *Pp-luc*: 5' -...cgaggugaaccaucacguacgcggaauacuucgaaaugucc...-3'
 objetivo anti-codificante *Pp-luc*: 3' -...gcuccacuguagugcaugcgcccuuaugaagcuuuacagg...-5'

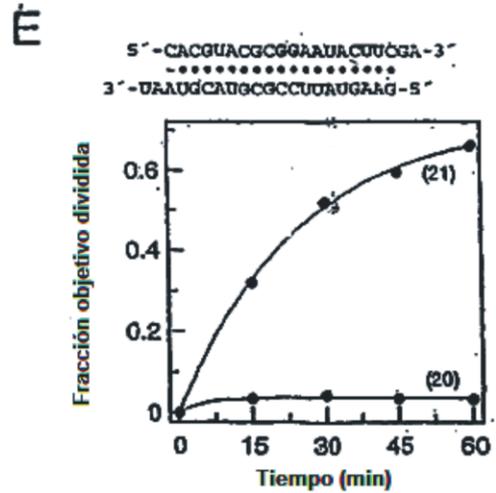
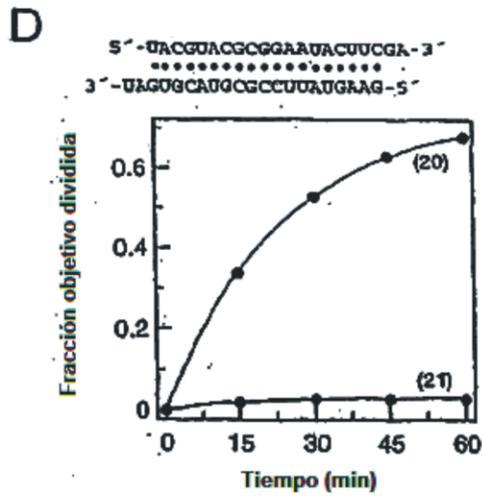
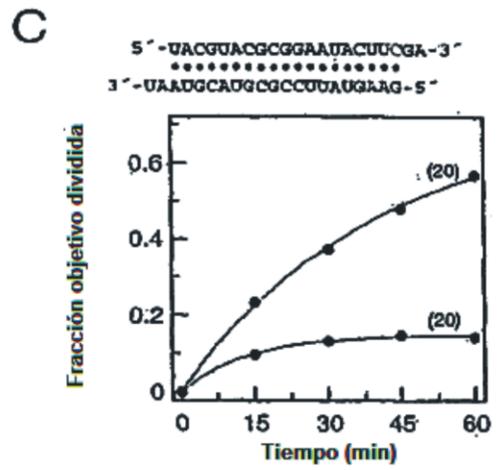
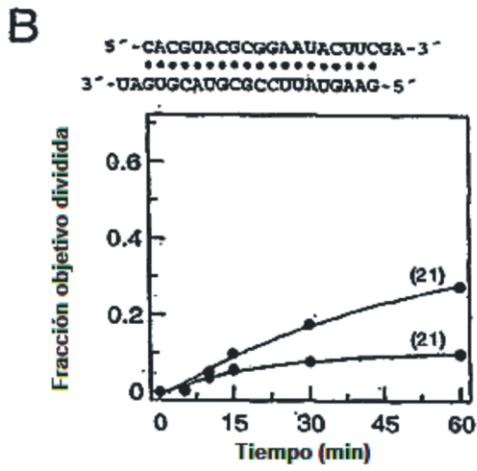


FIGURA 3

A objetivo codificante sod1: 5'-agagaggcauguuggagacuugggcaaugugacugcugacaa...-3'
 objetivo anticodificante sod1: 3'-cuccguacaaccucugaaccoguuacacugacgacuguuuc...-5'

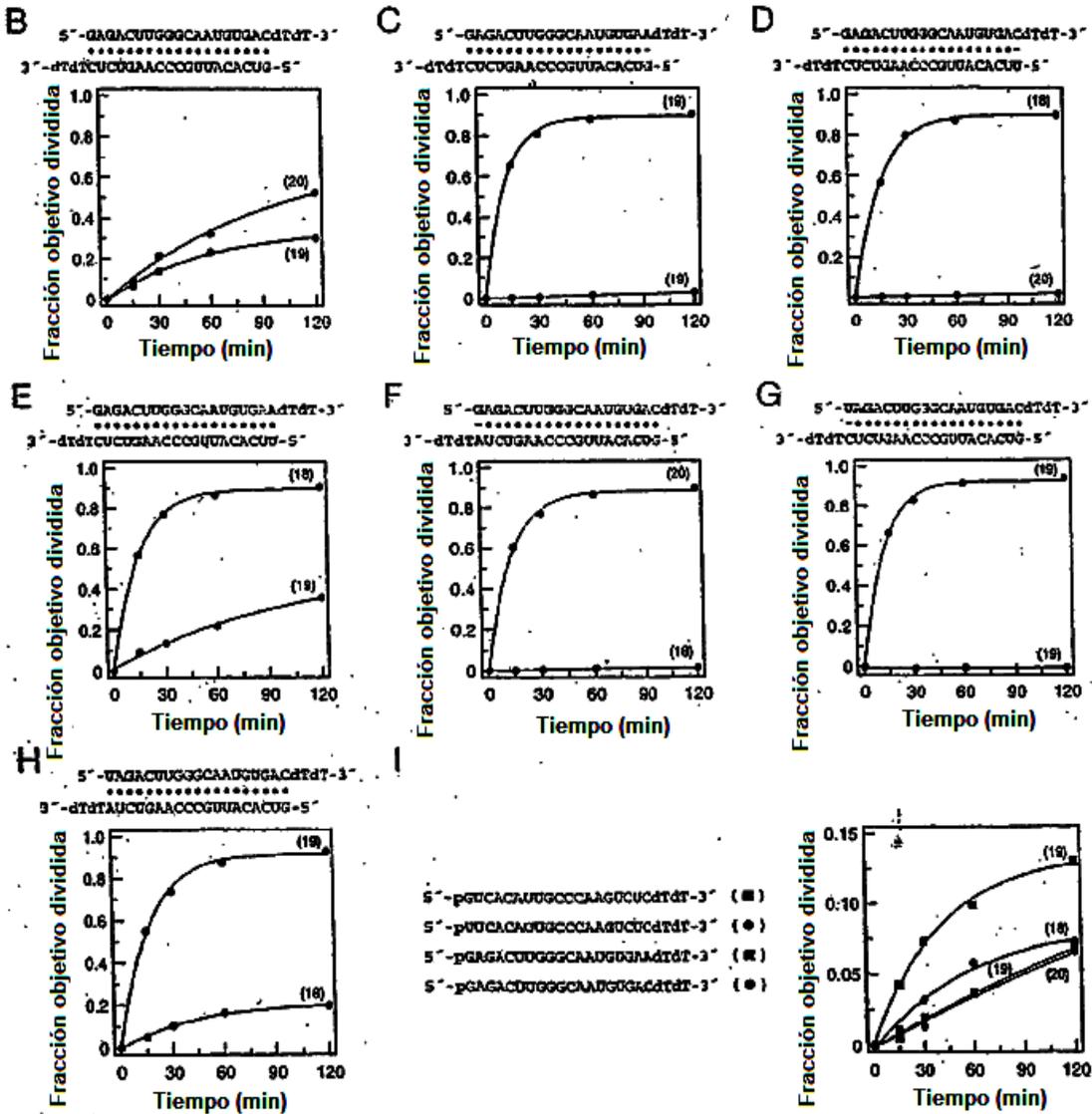


FIGURA 4

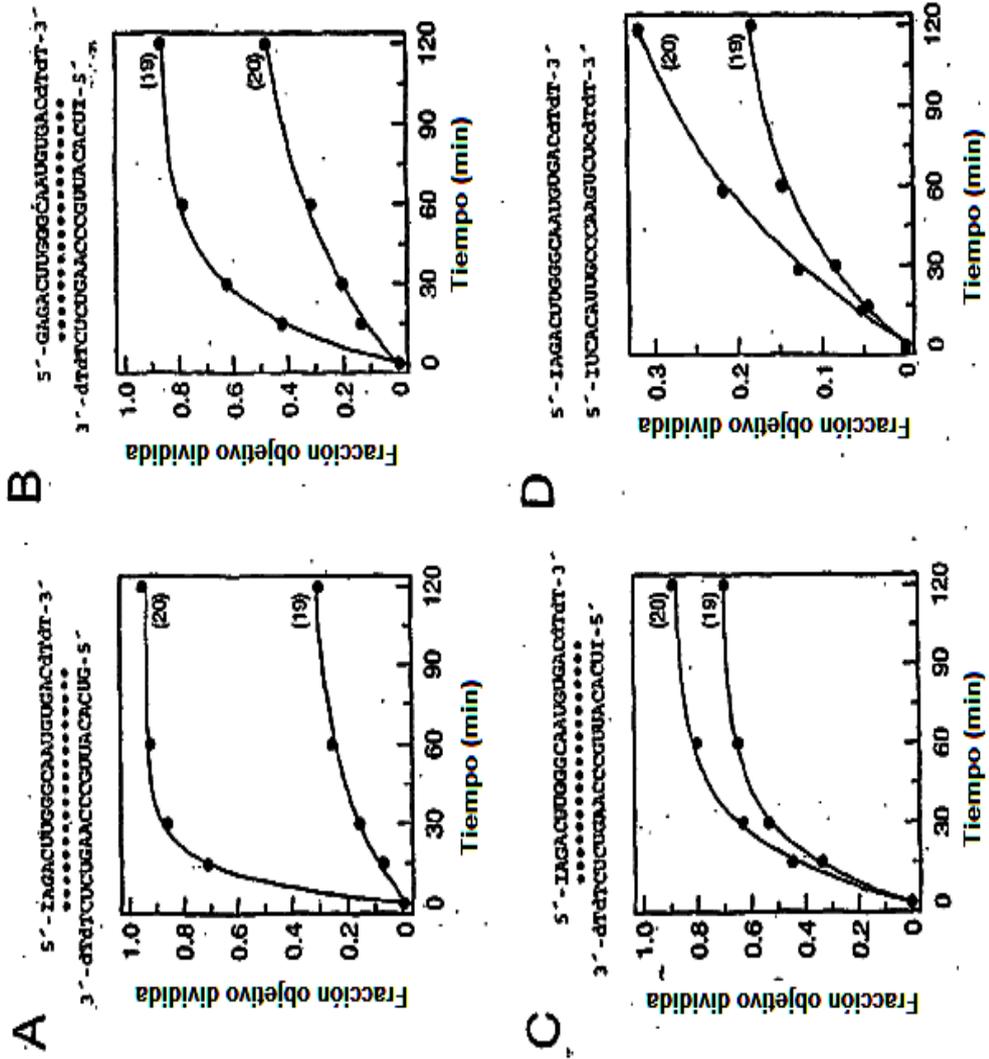


FIGURA 5

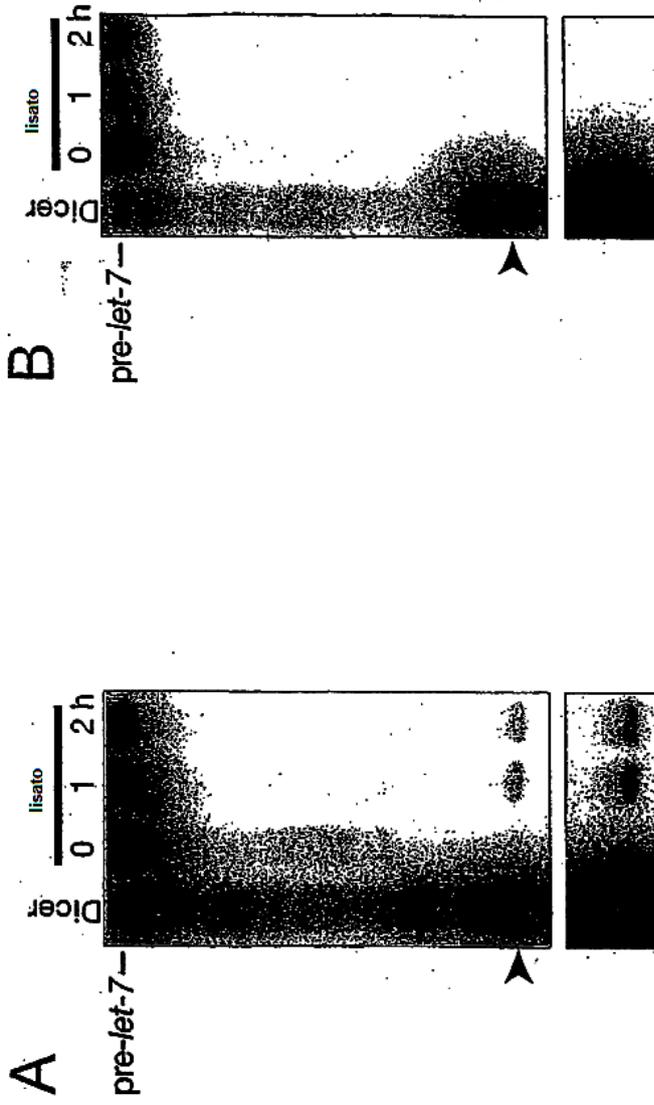


FIGURA 7

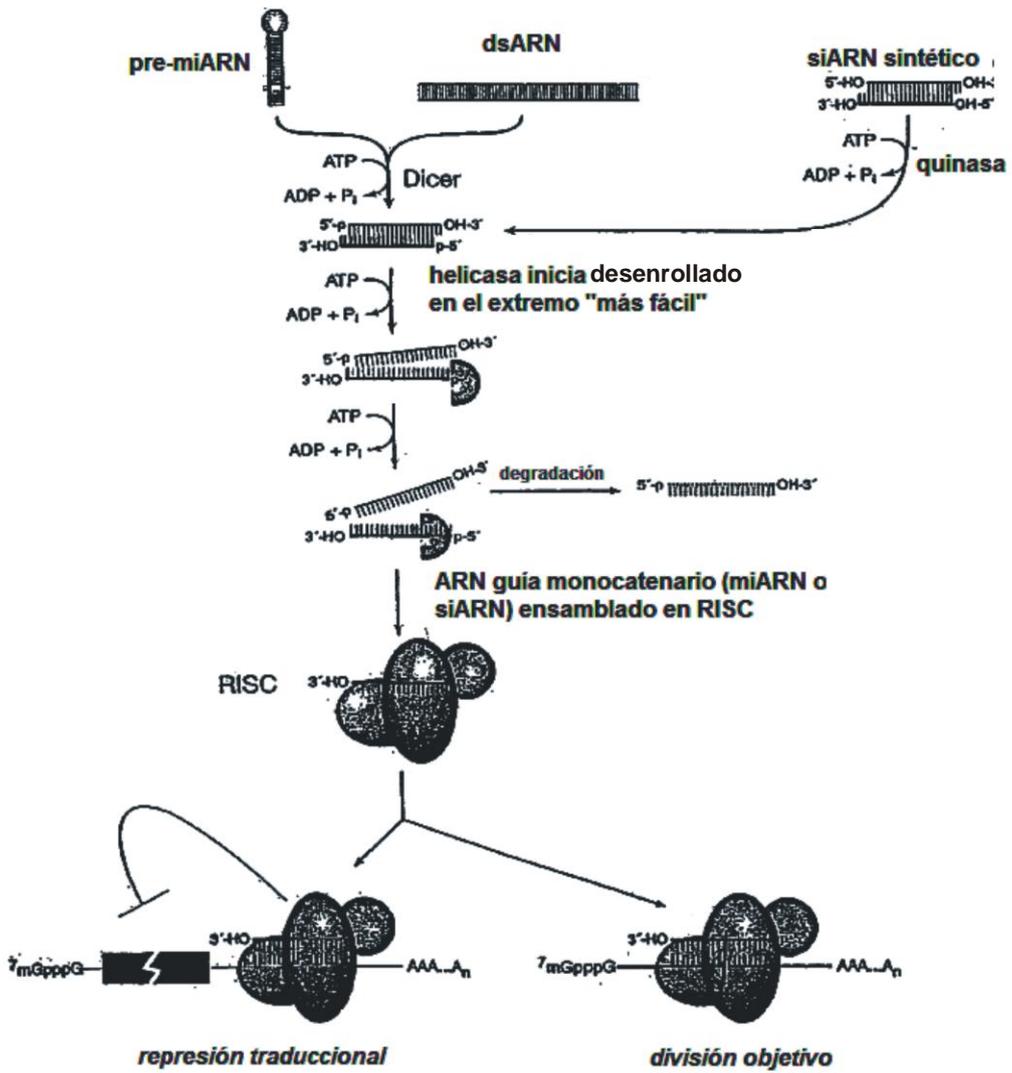
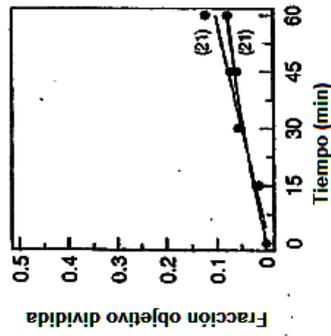


FIGURA 9

A Objeto codificante htt: 5'-...ugcagougaucaucgugugcuccuaggaacaguuuc...-3'
 Objeto anticodificante htt: 3'-...a cguacugauguacacagacugggacuccuugucaag...-5'

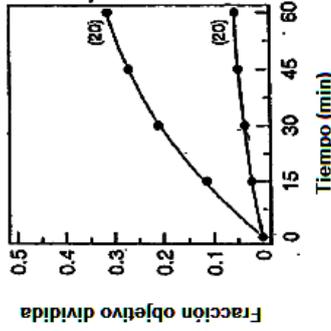
B 5'-UGUGCUAACCCTGGAGAAAG-3'

 3'-CUACACGACUGGGAACCCUUG-5'



C 5'-UGUGCUAACCCTGGAGAAAG-3'

 3'-CUACACGACUGGGAACCCUUG-5'



D 5'-UGUGCUAACCCTGGAGAAAG-3'

 3'-CUACACGACUGGGAACCCUUG-5'

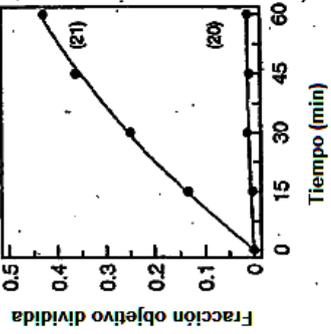
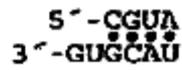
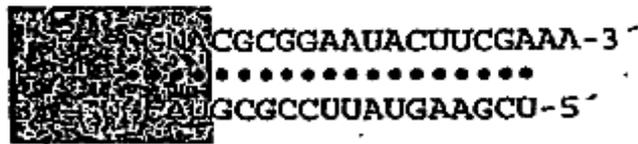
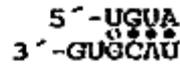
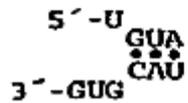
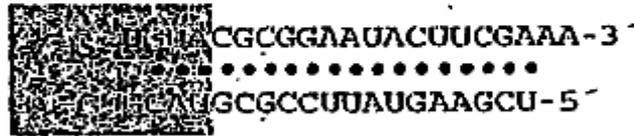


FIGURA 10

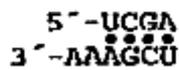
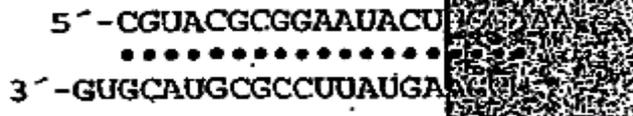


$\Delta G = -8.7 \text{ kcal/mol}$



$\Delta G = -7.4 \text{ kcal/mol}$

$\Delta G = -7.2 \text{ kcal/mol}$



$\Delta G = -8.4 \text{ kcal/mol}$

FIGURA 11

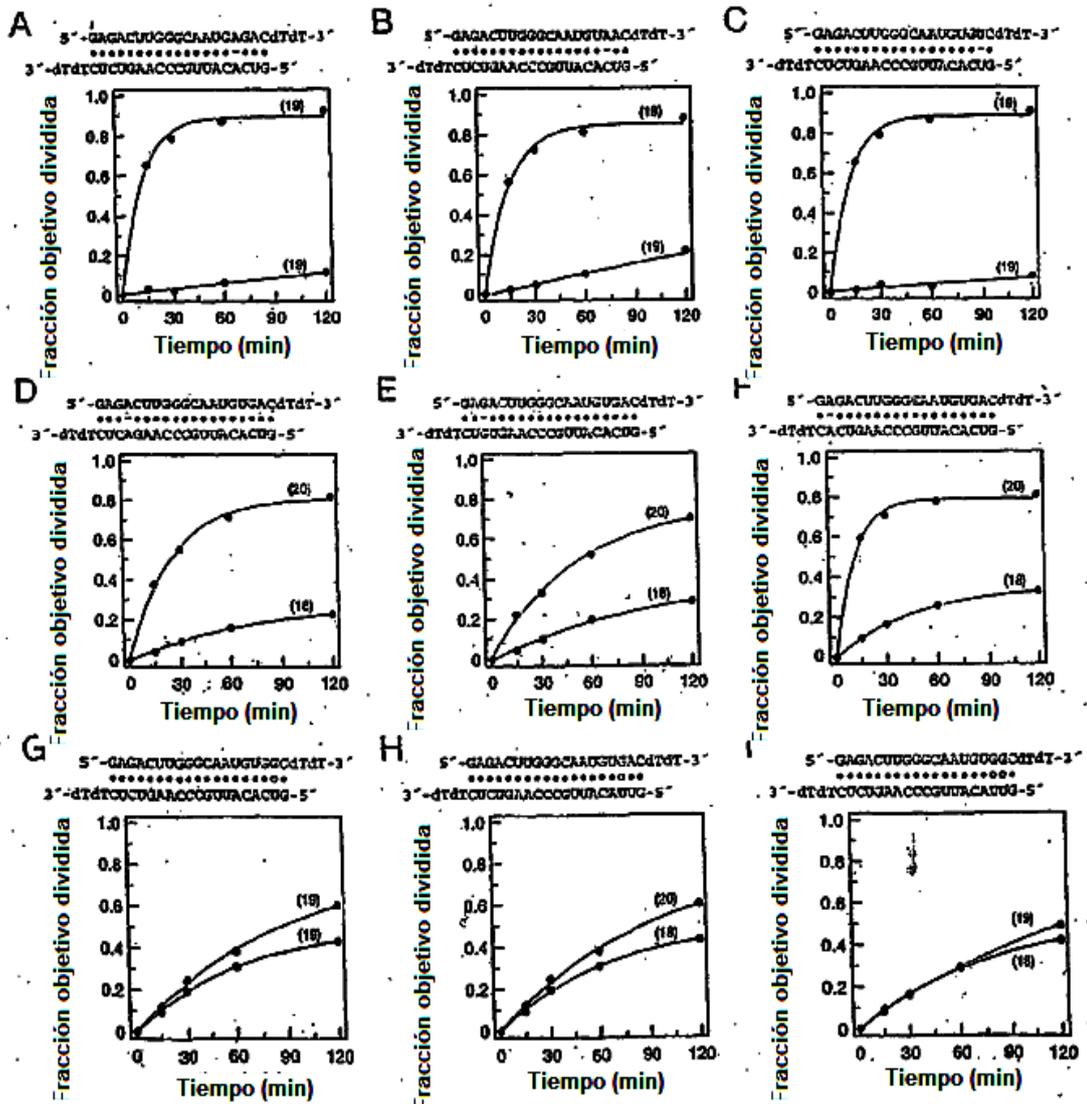


FIGURA 12

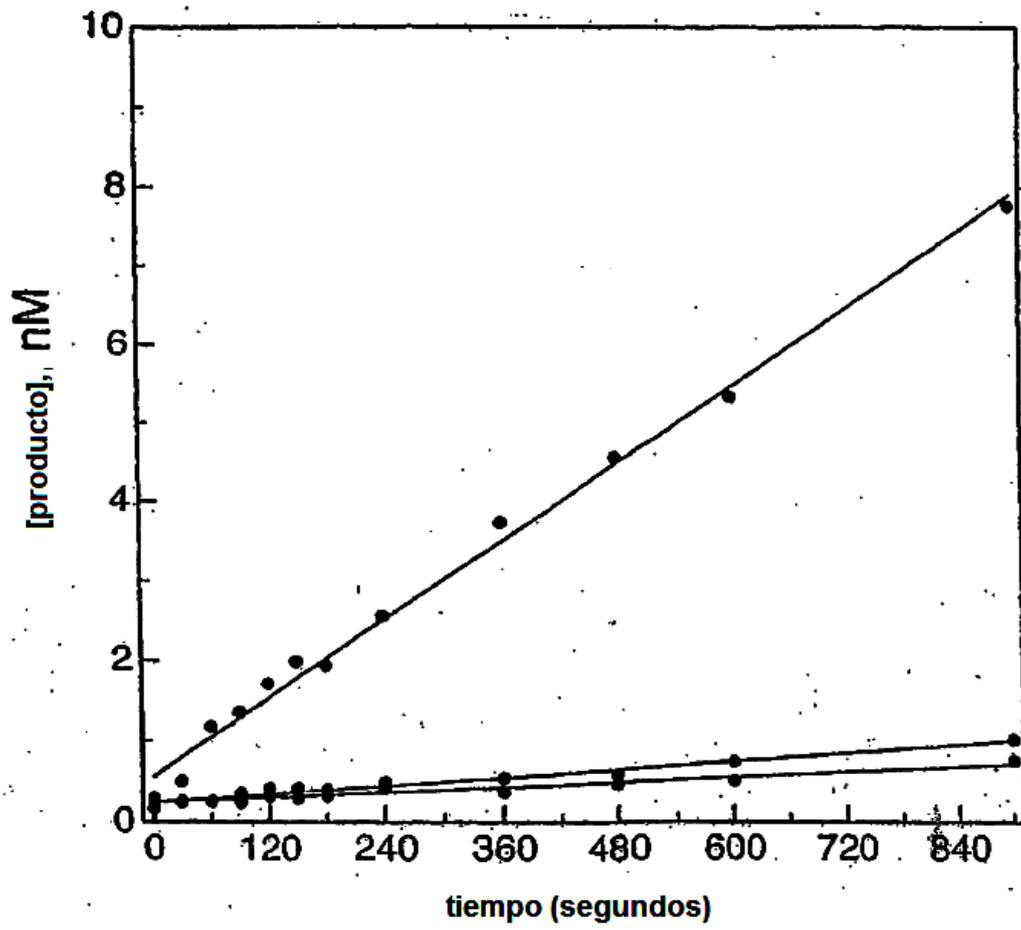


FIGURA 13

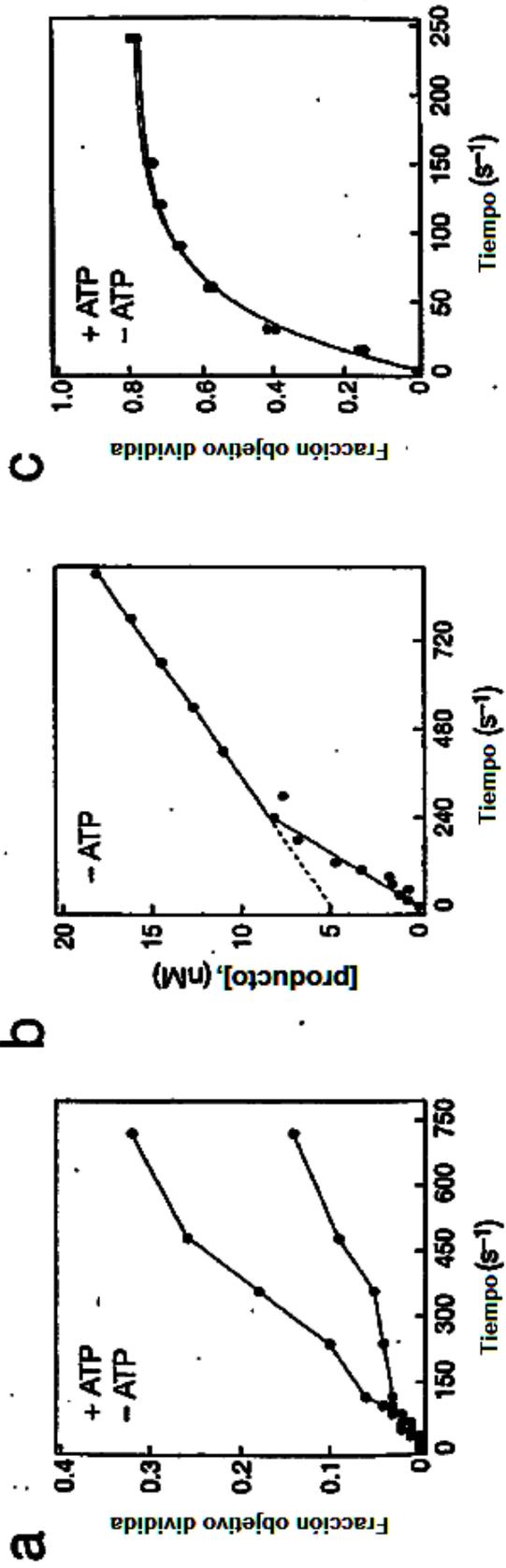


FIGURA 16

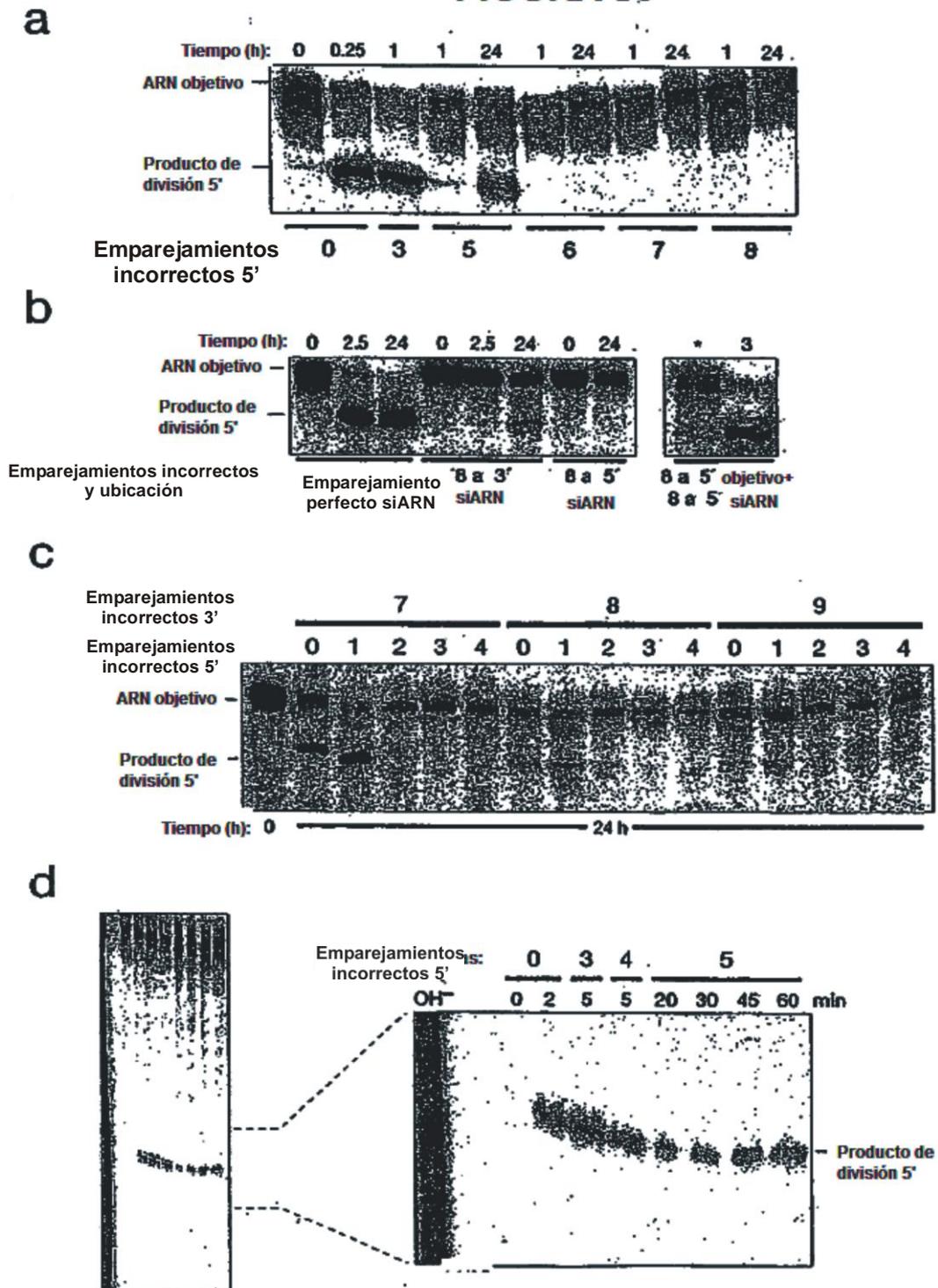


FIGURA 17

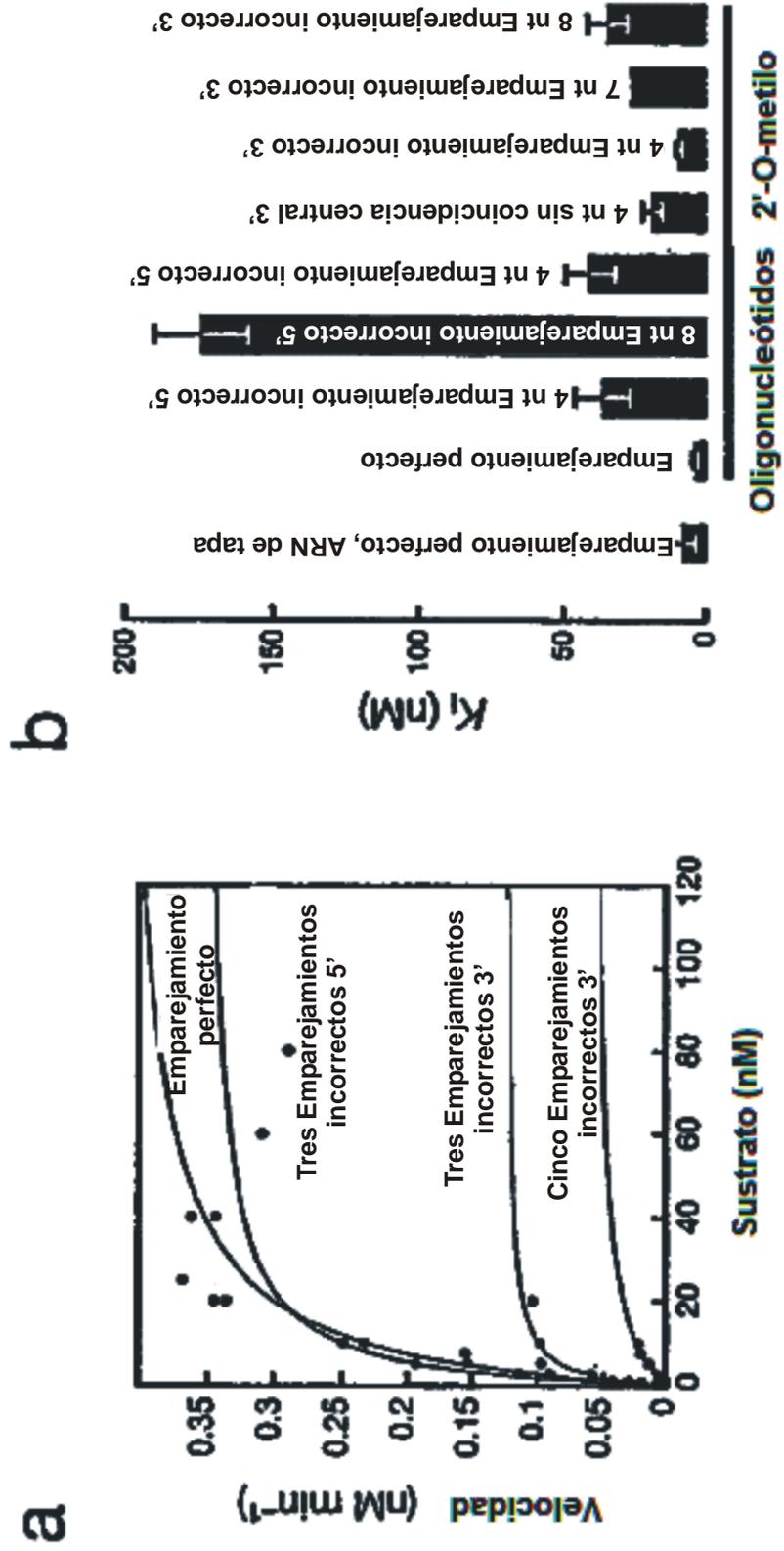


FIGURA 18

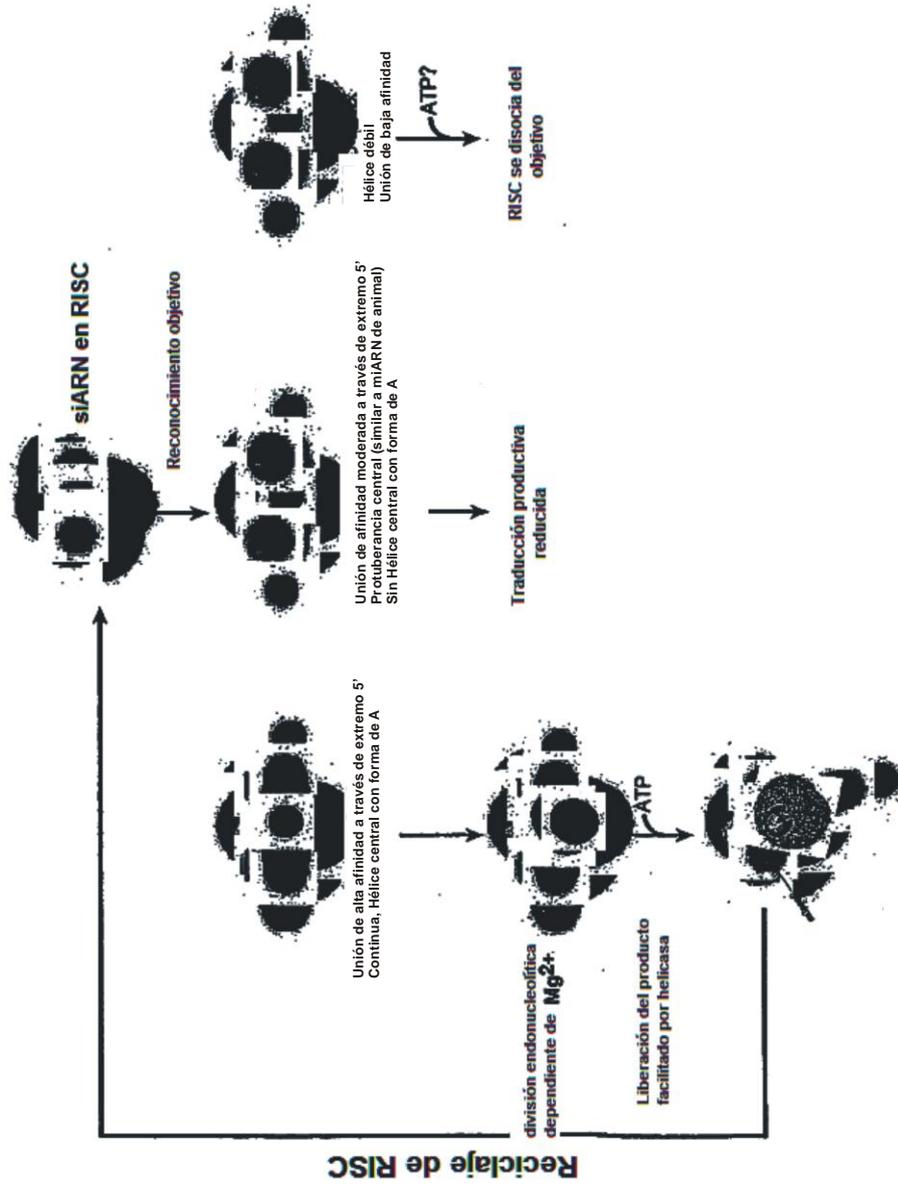


FIGURA 19

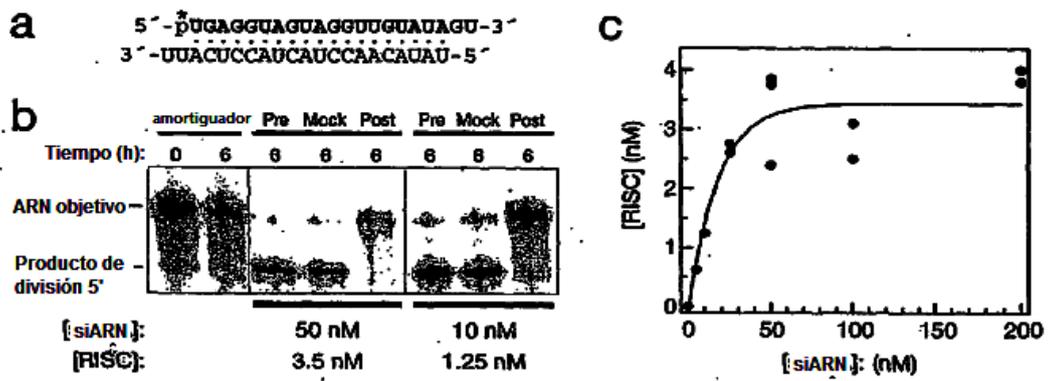
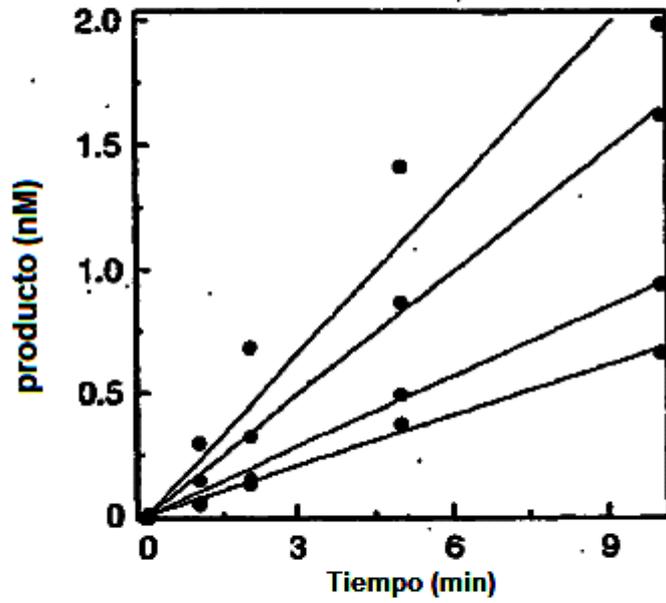


FIGURA 20

a



b

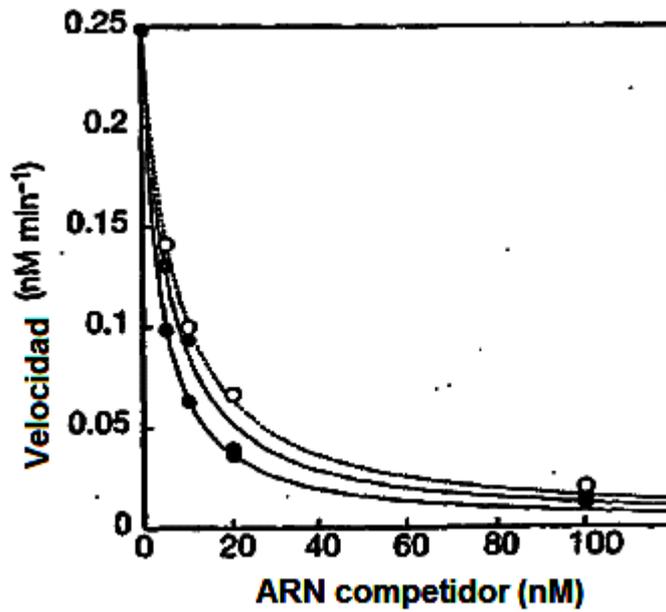


FIGURA 21

Objetivo y siARN	Figura #
<p>Objetivo: siARN completamente emparejado</p> <pre> 3'-...CCAACTCCATCCATCCACATACCCACUU...-5' 5'-UGAGGUAUGGAGGUAUGGAGGUAUGG-3' 3'-UUAUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCU-5' </pre>	<p>Figuras 2b-d, 3a,b y 5a</p>
<p>Objetivo: 1 nt siARN de emparejamiento incorrecto 3'</p> <pre> 3'-...CCAACTCCATCCATCCACATACCCACUU...-5' 5'-UGAGGUAUGGAGGUAUGGAGGUAUGG-3' UUAUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCU </pre>	
<p>Objetivo: 2 nt siARN de emparejamiento incorrecto 3'</p> <pre> 3'-...CCAACTCCATCCATCCACATACCCACUU...-5' 5'-UGAGGUAUGGAGGUAUGGAGGUAUGG-3' UUUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCU </pre>	
<p>Objetivo: 3 nt siARN de emparejamiento incorrecto 3'</p> <pre> 3'-...CCAACTCCATCCATCCACATACCCACUU...-5' 5'-UGAGGUAUGGAGGUAUGGAGGUAUGG-3' UUUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCU </pre>	
<p>Objetivo: 4 nt siARN de emparejamiento incorrecto 3'</p> <pre> 3'-...CCAACTCCATCCATCCACATACCCACUU...-5' 5'-UGAGGUAUGGAGGUAUGGAGGUAUGG-3' UUUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCU </pre>	
<p>Objetivo: 5 nt siARN de emparejamiento incorrecto 3'</p> <pre> 3'-...CCAACTCCATCCATCCACATACCCACUU...-5' 5'-UGAGGUAUGGAGGUAUGGAGGUAUGG-3' UUUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCU </pre>	<p>Figura 3c</p>
<p>Objetivo: 6 nt siARN de emparejamiento incorrecto 3'</p> <pre> 3'-...CCAACTCCATCCATCCACATACCCACUU...-5' 5'-UGAGGUAUGGAGGUAUGGAGGUAUGG-3' UUUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCU </pre>	
<p>Objetivo: 8 nt siARN de emparejamiento incorrecto 3'</p> <pre> 3'-...CCAACTCCATCCATCCACATACCCACUU...-5' 5'-UGAGGUAUGGAGGUAUGGAGGUAUGG-3' UUUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCU </pre>	
<p>Objetivo: 10 nt siARN de emparejamiento incorrecto 3'</p> <pre> 3'-...CCAACTCCATCCATCCACATACCCACUU...-5' 5'-UGAGGUAUGGAGGUAUGGAGGUAUGG-3' UUUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCU </pre>	

TABLA 1

Tabla 1 Análisis cinético de RISC

Resumen de datos cinéticos del análisis en la Figura 17A. Para comparación, se proporcionan los valores K_M y k_{cat} de cuatro enzimas de proteína bien estudiadas 43,44. se reporta K_M y $k_{cat} \pm$ error de ajuste.

Emparejamientos incorrectos, posición	K_M (nM)	V_{max} (nM s ⁻¹)	[RISC] (nM)	k_{cat} (s ⁻¹)	$k_{cat} K_M^{-1}$ (nM ⁻¹ s ⁻¹)	cambio en veces, $k_{cat} K_M^{-1}$
ninguno	8.4 ± 1.6	0.0071	1	7.1 x 10 ⁻³	8.4 x 10 ⁻⁴	1.00
tres nt 3'	2.7 ± 0.6	0.0022	2	1.1 x 10 ⁻³	3.8 x 10 ⁻⁴	0.46
cinco nt 3'	6.0 ± 1.8	0.0054	2	2.7 x 10 ⁻⁴	4.5 x 10 ⁻⁵	0.05
tres nt 5'	4.7 ± 1.3	0.0063	2	3.2 x 10 ⁻³	6.7 x 10 ⁻⁴	0.80

Enzimas de referencia	K_M (nM)	k_{cat} (s ⁻¹)	$k_{cat} K_M^{-1}$ (nM ⁻¹ s ⁻¹)	$k_{cat} K_M^{-1}$ con relación a RISC
Ureasa (ref 43)	2.5 x 10 ⁷	1 x 10 ⁴	4.0 x 10 ⁻⁴	0.47
Fumarasa (ref 43)	5.0 x 10 ³	8 x 10 ²	1.6 x 10 ⁻¹	190
Catalasa (ref 43)	2.5 x 10 ⁷	1 x 10 ⁷	4.0 x 10 ⁻¹	8940
RNasa H1 (ref 44)	3.8 x 10 ⁴	5 x 10 ³	1.3 x 10 ⁻³	0.03