



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 126**

51 Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
C12N 15/864 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05727680 .0**
96 Fecha de presentación : **04.03.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1725660**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.11.2006**

54 Título: **Cassette de expresión de promotor múltiple para el suministro simultáneo de agentes ARNi.**

30 Prioridad: **05.03.2004 US 550504 P**
17.03.2004 US 553920 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.10.2011

73 Titular/es: **BENITEC, Inc.**
2375 García Avenue
Mountain View, California 94043, US

72 Inventor/es: **Roelvink, Petrus, W.;**
Suhy, David, A. y
Kolykhalov, Alexander A.

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 366 126 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cassette de expresión de promotor múltiple para el suministro simultáneo de agentes ARNi

5 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La utilización de ARN de doble cadena para inhibir la expresión de genes de manera específica de una secuencia ha revolucionado la industria de descubrimiento de medicamentos. En los mamíferos, la interferencia de ARN o ARNi, está mediada por moléculas de ARN con una longitud de 19 a 29 nucleótidos, de doble cadena, a las que se hace referencia como ARN de interferencia pequeña, que son derivadas por fraccionamiento enzimático de ARN largo, de doble cadena, dentro de células *in vivo*. Los agentes ARNi pueden ser sintetizados químicamente o enzimáticamente fuera de células, y pueden ser suministrados a continuación a células (ver, por ejemplo Fire, y otros, *Nature*, 391:806-11 (1998); Tuschl, y otros, *Genes, y Dev*, 13: 3191-97 (1999); y Elbashir, y otros, *Nature*, 411:494-498 (2001)); o se pueden expresar *in vivo* por un vector apropiado en células (ver, por ejemplo, McCaffrey, y otros, *Nature Biotech.* 21 (6): 639-644 (2003)).

No obstante, el suministro *in vivo* de ARNi sin modificar, como terapéutica efectiva para su utilización en humanos, se enfrenta a una serie de dificultades técnicas. En primer lugar, debido a nucleasas celulares y del suero, la media vida del ARN inyectado *in vivo* es solamente de unos 70 segundos (ver, por ejemplo, Kurreck, *Eur. J. Bioch.* 270:1628-44 (2003)). Se han hecho esfuerzos para incrementar la estabilidad del ARN inyectado mediante la utilización de modificaciones químicas; no obstante, hay varios casos en los que las alteraciones químicas han conducido a efectos citotóxicos mayores. En un ejemplo específico, las células eran intolerantes a dosis de un ARNi duplex, en el que cada segundo fosfato estaba sustituido por fosforotioato (Harboth, y otros, *Antisense Nucleic Acid Drug Rev.* 13(2): 83-105 (2003)). Otros problemas comprenden el suministro específico de tejidos, así como la posibilidad de suministrar los agentes ARNi en cantidades suficientes para elicitar una respuesta terapéutica, pero que no sean tóxicos.

Varias opciones están siendo exploradas para el suministro de ARNi, incluyendo la utilización de sistemas de vectores basados en virus que pueden infectar células diana y suministrar y expresar moléculas de ARNi *in situ*. De manera típica, ARN de pequeñas dimensiones, aproximadamente 70 nucleótidos, son transcritos como precursores cortos de horquilla (ARNsh) desde un núcleo de vector vírico. Una vez transcritos, los ARNsh son procesados por la enzima Dicer en especies activas de ARNi apropiadas. Los sistemas de suministro basados en virus intentan explotar las propiedades de direccionado de virus para generar especificidad para tejidos, y una vez han sido apropiadamente direccionados, se basan en una mecánica celular endógena para generar suficientes niveles de especies de ARNi para conseguir una dosis terapéuticamente efectiva.

En la actualidad, los virus más habitualmente utilizados para el suministro de secuencias diana son los que se basan en sistemas evolucionados de retrovirus, virus de herpes simplex (HSV, o adenovirus (Ad)). Todos estos vectores pueden recibir insertos grandes y pueden ser producidos con titulaciones terapéuticamente relevantes. No obstante, en todos los sistemas hay preocupaciones con respecto al desarrollo de cáncer (Cavazzana-Calvo, y otros, *Science*, 288:669-72 (2000)), así como respuestas inmunes del huésped poco deseables, y toxicidad resultante en los pacientes. Otro virus que es útil para el suministro de ARNi es el virus adeno-asociado (AAV).

Una aplicación útil de la terapéutica de ARNi es un agente antivírico. En general, los virus ARN dependen de ARN polimerasa dependiente de ARN/ADN para replicación. Dichas polimerasas ARN/ADN replican el genoma vírico con una fidelidad comparativamente baja, cuya consecuencia funcional produce genomas con un número excepcionalmente elevado de mutaciones. Esto resulta en la capacidad de evolución rápida de viriones de progenie para evadirse de los agentes habituales inmunológicos y químicos antivíricos. Por esta razón, de manera similar a los efectos observados con terapéutica de moléculas pequeñas, la potencia y eficacia relativas de la terapéutica de ARNi puede disminuir como resultado de la evolución vírica durante tratamiento a largo plazo. En un estudio, aparecieron mutantes de escape de VIH, que contenían un único cambio de nucleótido 35 días después del suministro de un ARNsh expresado (Boden, y otros, *J. Virol* 77(21): 11531-11535 (2003)). En otro estudio, se pudieron detectar mutantes de escape poliovirus en un periodo corto de 54 horas después de la infección en células que habían sido transfectadas con ARNi presintetizado. No obstante, el suministro simultáneo de dos ARNi contra secuencias diana múltiples dentro del virus retrasaron significativamente el inicio de las variantes de escape (ver Gitlin, y otros, *Nature*. 418:430-434 (2002)).

Por lo tanto, existe en la técnica la necesidad de desarrollar terapéuticas de ARNi, efectivas y estables. La presente invención satisface esta necesidad del sector.

60 **RESUMEN DE LA INVENCION**

La presente invención está dirigida a composiciones innovadoras y a su utilización en el suministro de especies o agentes de ARNi a células diana. Las especies ARNi forman parte de un constructo de expresión de un promotor múltiple, suministrado preferentemente mediante un sistema de suministro vírico. Dado que se utilizan tres o más

agentes ARNi por constructo, la presente invención es particularmente útil en el direccionado de organismos con genes diana, que tienen diferencias de secuencia (SNPs) entre variantes, de manera que cada uno de los agentes de ARNi introducidos puede ser dirigido a uno o varios subconjuntos de variantes. De manera similar, las composiciones y utilidades de la presente invención son también útiles en el tratamiento de estados de enfermedad provocados por patógenos rápidamente mutantes, tales como enfermedades provocadas por agentes víricos basados en ARN; es decir, es menos probable que los mutantes de escape vírico sean capaces de evitar el efecto de tres o más secuencias distintas de ARNi.

Por esta razón, las realizaciones de la presente invención facilitan un cassette de expresión de promotor múltiple, que comprende: como mínimo, tres componentes promotor/ARNi/finalizador, en el que cada componente promotor/ARNi/finalizador comprende un elemento promotor, un elemento finalizador, y una secuencia que codifica una especie de ARNi enlazada de manera operativa al elemento promotor y al elemento finalizador, de manera que la especie ARNi se dirige a una secuencia de ácido nucleico transcrita, y, como mínimo, una de las especies de ARNi es codificada por SEQ ID N°: 22. Preferentemente, en el caso de que la secuencia de cada una de las especies de ARNi son distintas entre sí. En varios aspectos preferentes de esta realización, la secuencia de cada uno de los elementos promotores del cassette de expresión de promotor múltiple son diferentes entre sí. En otros aspectos de esta realización, la secuencia de cada uno de los elementos de finalización en el cassette de expresión de promotor múltiple son distintas entre sí y/o cada elemento de finalización es tomado del mismo gen que el elemento promotor con el que está apareado en la naturaleza. Además, en un aspecto de esta realización, la presente invención da a conocer un constructo de expresión de promotor múltiple que contiene elementos necesarios para el empaquetado del vector terapéutico en partículas de virus infeccioso.

En otra realización de la presente invención, el constructo genético antes descrito está destinado a su utilización en la inhibición de una o varias secuencias de ácido nucleico transcritas a partir de virus de hepatitis C, o para utilización en la inhibición de una o varias secuencias de ácido nucleico transcritas a partir de virus de hepatitis C, de manera que dicho constructo genético está empaquetado en partículas víricas o no víricas. En aspectos de esta realización de la invención, la secuencia o secuencias transcritas de ácido nucleico son genes necesarios para la infección o mantenimiento de la infección de las células por el virus de hepatitis C. Una realización alternativa de la invención incluye la utilización del constructo genético antes mencionado en la fabricación de un medicamento a utilizar en la inhibición de una o varias secuencias de ácido nucleico transcritas a partir de virus de hepatitis C, o para utilización en la inhibición de una o varias secuencias de ácido nucleico transcritas a partir de virus de hepatitis C, de manera que dicho constructo genético está empaquetado en partículas víricas o no víricas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

A efectos de que el modo en el que las características, ventajas y objetivos de la presente invención, anteriormente relacionados, se consigan y puedan ser comprendidos de manera detallada se realizará una descripción más específica de la invención, que se ha resumido brevemente en lo anterior, haciendo referencia a las realizaciones ilustradas en los dibujos adjuntos. No obstante, se tiene que observar que los dibujos adjuntos muestran solamente ciertas realizaciones de la presente invención y, por lo tanto, no se consideran limitadores de su ámbito puesto que la presente invención puede admitir otras realizaciones igualmente efectivas, que se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

La figura 1 es un diagrama de bloques simplificado de una realización de un método para el suministro de una especie ARNi de acuerdo con la presente invención.

Las figuras 2A y 2B son representaciones esquemáticas simplificadas de realizaciones del cassette de expresión de ARNi de promotor múltiple de la presente invención.

Las figuras 3A y 3B muestran dos realizaciones de cassette de expresión múltiple que suministran agentes ARNi como precursores de ARNsh. La figura 3C muestra una realización de un cassette de expresión múltiple que comprende regiones de relleno insertadas entre componentes promotor/ARNi/finalizador. Las figuras 3D y 3E muestran realizaciones de cassettes de expresión ARNi promotor múltiple que suministran ARNi sin precursor ARNsh.

La figura 4A es una representación simplificada de un método para la producción de vectores de expresión ARNi de promotor múltiple empaquetados en partículas víricas. La figura 4B es una representación simplificada de otro método de producción de vectores de expresión ARNi de promotor múltiple empaquetados en partículas víricas.

La figura 5 es una vista esquemática de una realización de un constructo de expresión recombinante de prueba AAV (rAAV) y un constructo indicador de luciferasa.

La figura 6 es una vista esquemática de un vector de expresión autocomplementario (sc AAV) ARNi de acuerdo con una realización de la presente invención.

La figura 7 es una representación esquemática de un constructo de prueba promotor representativo y un constructo indicador.

5 La figura 8A es una vista esquemática de un genoma de HCV que muestra la posición de los agentes ARNi comprobados en experimentos descritos en esta descripción. La figura 8B es una vista esquemática de un replicón de fusión luciferasa-HCV, que contiene elementos genéticos para proteínas no estructurales. La figura 8C es un esquema de un replicón de fusión luciferasa-HCV, conteniendo elementos genéticos de HCV para proteínas estructurales y no estructurales.

10 La figura 9 es una representación esquemática de dos plásmidos indicadores de fusión luciferasa-HCV útiles para comprobar agentes ARNi. El constructo de la izquierda comprende una secuencia de 100 bp de HCV fusionada en un gen de luciferasa; mientras que el constructo de la derecha comprende 3 secuencias distintas de 100 bp de HCV fusionadas con un gen de luciferasa. Agentes de ARNi dirigidos a una secuencia contenida dentro de la región de 100 bp, en caso de que sean efectivos, degradarán el producto de transcripción de HCV-luciferasa, disminuyendo de este modo (quizás eliminando) la expresión de luciferasa.

15 La figura 10 es una ilustración gráfica de una realización de un cassette promotor triple que muestra lugares de restricción únicos, útiles para ensamblado modular de varios agentes ARNi, elementos promotores, y elementos finalizadores.

20 La figura 11A es un ejemplo de una secuencia (SEQ ID N° 31) del cassette promotor triple del tipo mostrado en la figura 3B. Las figuras 11B/11C son un ejemplo de una secuencia (SEQ ID N° 32) del tipo de cassette promotor triple mostrado en la figura 3C.

25 La figura 12 muestra los resultados de la inhibición de la expresión de luciferasa medidos en unidades de luz relativas (RLU) por diferentes agentes de ARNi dirigidas a cinco regiones distintas de 100 bp de HCV.

La figura 13 muestra los resultados de inhibición de expresión de luciferasa por diferentes agentes ARNi, expresados como porcentaje de valor de inhibición.

30 La figura 14 muestra la reproductibilidad de los resultados de experimentos llevados a cabo comprobando cuatro agentes ARNi diferentes con diana en varios segmentos de una secuencia de 100 bp desde la región 5' de HCV.

35 La figura 15 muestra el cambio en el porcentaje de inhibición de la expresión de luciferasa 24 horas después de la transfección y 48 horas después de la transfección para cinco diferentes agentes de ARNi con diana en varios segmentos de una secuencia de 100 bp en la región 5' de HCV.

40 La figura 16 muestra el cambio en el porcentaje de inhibición de expresión de luciferasa 44 horas después de la transfección y 72 horas después de la transfección para dos agentes ARNi diferentes con diana en varios segmentos de una secuencia de 100 bp en la región 5' de HCV, con cinco agentes diferentes ARNi con diana en varios segmentos de una secuencia de 100 bp en la región 3' de HCV, y un agente ARNi con diana en un segmento de una secuencia 100 bp en la región de marco de lectura abierto de HCV.

45 Las figuras 17A y 17B muestran datos que valoran la concentración de tres promotores Pol III. Se insertó una secuencia ARNsh específica de ARNm de luciferasa de luciérnaga (McCfrey y otros, 2002) bajo el control del promotor indicado Pol III. El ADN plásmido resultante fue cotransfectado junto con un plásmido indicador de luciferasa en células Huh7 (Figura 17A) o bien en células 293 (Figura 17B). Los niveles de luciferasa fueron medidos 72 horas después de la transfección. En constructos de promotor triple de la figura 3B (a la derecha tres constructos en cada panel) se indica el ARNsh que activa el promotor.

50 La figura 18 muestra la inhibición de la expresión de luciferasa con diferentes agentes ARNsi en un ensayo de plásmido indicador de fusión luciferasa-HCV. El plásmido indicador de luciferasa-HCV fue cotransfectado con cada uno de los agentes ARNsi en células Huh7, y la actividad de luciferasa fue medida 48 horas más tarde.

55 La figura 19 muestra la actividad de agentes ARNsi seleccionados contra un replicón de fusión de luciferasa subgenómica-HCV. Los agentes ARNsi comprobados fueron transfectados en células 293 junto con una cantidad de trazas de ADN de control pGL3 (como control de la eficiencia de la transfección). Se midieron ambos niveles de "renilla" luciferasa y luciérnaga 48 horas más tarde.

60 La figura 20 muestra la inhibición porcentual de señal de luciferasa a partir de un plásmido indicador de luciferasa-HCV después de cotransfección con plásmidos, comprendiendo cassettes de promotor/ARNsh conteniendo uno o dos promotores activos.

65 La figura 21 muestra la inhibición porcentual de señal de luciferasa a partir de un plásmido indicador de luciferasa-HCV que contiene la región de codificación C12 (parte superior), región de codificación C-9 (parte media), o región

5,6 (parte inferior) después de cotransfección con plásmidos que comprenden uno, dos o tres cassettes activos de promotor/ARNsh.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 Antes de describir las presentes composiciones y utilizaciones, se tiene que comprender que la presente invención no está limitada a la metodología, productos, aparatos, y factores descritos específicos, dado que dichos métodos, aparatos, y formulaciones pueden, evidentemente, variar. También, se ha de comprender que la terminología utilizada en esta descripción está destinada al objetivo de describir realizaciones específicas solamente, y no está destinada a limitar el alcance de la presente invención, que está limitada solamente por las reivindicaciones adjuntas.

15 Tal como se utilizada en esta descripción, las formas simulares “a”, “y”, y “el” incluyen los plurales excepto que el contexto indique otra cosa de forma clara. Así, por ejemplo, la referencia a un “factor” indica un factor o mezcla de factores, y la referencia a “método de producción” comprende la referencia a etapas equivalentes y métodos conocidos por los técnicos en la materia, y así sucesivamente.

20 Si no se define de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta descripción tienen el mismo significado, habitualmente entendido por un técnico ordinario en la materia a la que pertenece la invención.

25 En la siguiente descripción, se han indicado numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión más completa de la presente invención. No obstante, será evidente para un técnico en la materia que la presente invención, tal como se ha definido por las reivindicaciones adjuntas, se puede practicar sin uno o varios de estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito características y procedimientos bien conocidos por los técnicos de la materia a efectos de evitar faltas de claridad en la invención.

30 La presente invención está dirigida a composiciones innovadoras genéticamente consistentes, y su utilización para el suministro de, como mínimo, tres diferentes agentes ARNi, simultáneamente a una célula utilizando un solo constructo de expresión. Las composiciones y utilizaciones dan a conocer una inhibición estable y duradera de ácidos nucleicos diana.

35 De modo general, se utilizan en la presente invención métodos convencionales de biología molecular, microbiología, técnicas de ADN recombinante, biología celular y biología, que se encuentran dentro del estado de la técnica. Estas técnicas se explican de manera completa en la literatura, por ejemplo Maniais, Fritsch & Sambrook, (clonado molecular: Manual de Laboratorio) (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I y II (D. N. Glover, ed. 1985) (Clonado de ADN: Sistema práctico, Volúmenes I y II); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed. 1984) (Síntesis de Oligonucleótidos); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984) (Hibridación de ácido nucleico)); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed.1986) (Cultivo de células de animales; y RNA Viruses: A practical Approach, (Alan, J. Cann, Ed., Oxford University Press, 2000) (Virus de ARN: Sistema práctico).

40 Un “vector” es un replicón, tal como un plásmido, fago, constructo vírico o cósmido, al que se puede acoplar otro segmento de ADN. Los vectores son utilizados para transducir y expresar el segmento de ADN en células.

45 Un “promotor” o “secuencia promotora” es una región reguladora de ADN capaz de unir ARN polimerasa en una célula e iniciar transcripción de una secuencia de codificación de polinucleótido o polipéptido, tal como ARN mensajero, ARN ribosómico, ARN nuclear pequeño o nucleolar o cualquier tipo de ARN transcrito por cualquier clase de cualquier ARN polimerasa I, II o III.

50 Una célula ha sido “transformada”, “transducida” o “transfectada” por un ácido nucleico exógeno o heterólogo o por un vector cuando dicho ácido nucleico ha sido introducido dentro de la célula, por ejemplo, en forma de complejo con reactivos de transfección o empaquetado en partículas víricas. El ADN transformante puede o no estar integrado (enlazado covalentemente) en el genoma de la célula. Con respecto a células eucarióticas, una célula establemente transformada es aquella en la que el ADN transformante ha pasado a ser integrado en el cromosoma de la célula principal o se mantiene extracromosomalmente, de manera que el ADN transformante es heredado por células hijas durante la replicación celular o es una célula no replicante, diferenciada en la que se encuentra presente un episoma persistente.

60 El término “interferencia de ARN” o “ARNi” se refiere de manera general a un proceso en el que una molécula de ARN de doble cadena o una horquilla corta de ARN cambia la expresión de una secuencia de ácido nucleico con la que comparte homología sustancial o total. El término “especie de ARN” o “ARNi” se refiere de manera general a un proceso en el que una molécula de ARN de doble cadena o una horquilla corta de ARN cambia la expresión de una secuencia de ácido nucleico con la que comparte homología sustancial o total. El término “especie de ARN” o “agente ARNi” se refiere a una secuencia distinta de ARN que elicitada ARNi, y el término “cassette de expresión de ARNis” se refiere a un cassette de acuerdo con realizaciones de la presente invención que comprende tres o más especies de ARNi.

La figura 1 es un diagrama de flujos simplificado que muestra las etapas de un método en el que se pueden utilizar constructos de expresión ARNi de promotor múltiple de acuerdo con la presente invención. En primer lugar, en la etapa 200 se construye un cassette de expresión de ARNi de promotor múltiple que se plantea como diana una diana de enfermedad específica. A continuación, en la etapa 300, el cassette de expresión de ARNi de promotor múltiple es ligado en un constructo apropiado de suministro vírico. El constructo de suministro de expresión de ARNi vírico es empaquetado en partículas víricas en la etapa 400, y las partículas víricas son suministradas a las células diana a tratar en la etapa 500. Más adelante se presentan detalles de estas etapas y de los componentes involucrados.

Los constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple de base vírica, de acuerdo con la presente invención, pueden ser generados sintéticamente o enzimáticamente por una serie de protocolos distintos conocidos por los técnicos en la materia, y purificados utilizando técnicas de ARN recombinante estándar, tal como se ha descrito, por ejemplo, por Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), y según las normas descritas, por ejemplo, por el Departamento de HHS de Estados Unidos, Normas del Instituto Nacional de la Salud (NIH) para investigación de ADN recombinante. En una realización preferente, los cassettes de expresión de ARNi de promotor múltiple son sintetizados utilizando fósforamidita o elementos químicos análogos, utilizando protocolos bien conocidos en esta técnica.

Las figuras 2A y 2B son esquemas simplificados de cassettes de expresión de ARN de promotor múltiple de acuerdo con realizaciones de la presente invención. La figura 2A muestra una realización de un cassette (10) de expresión de promotor múltiple con tres componentes promotor/ARN/finalizador (mostrado con el numeral 20), y la figura 2B muestra una realización de un cassette de expresión de promotor múltiple (10) con cinco componentes promotor/ARN/finalizador (mostrado con el numeral 20). P1, P2, P3, P4 y P5 representan elementos promotores. ARNi 1, ARNi 2, ARNi 3, ARNi 4, y ARNi 5 representan secuencias para cinco especies diferentes de ARNi. T1, T2, T3, T4, y T5 representan elementos de finalización. Los cassettes de expresión de ARNi de promotor múltiple, según la presente invención, pueden contener tres o más componentes promotor/ARN/finalizador, en los que el número de componentes promotor/ARNi/finalizador, incluidos en cualquier cassette de expresión de ARNi de promotor múltiple, está limitado, por ejemplo, por el tamaño de empaquetado del sistema de suministro escogido (por ejemplo, algunos virus, tales como AAV, tienen limitaciones de dimensiones relativamente estrictas); toxicidad celular, y efectividad máxima (es decir, cuando, por ejemplo, la expresión de cuatro secuencias ARNi es tan efectiva, terapéuticamente, como la expresión de diez secuencias ARNi).

Las tres o más especies de ARNi de los componentes promotor/ARN/finalizador que comprenden un cassette, tienen todos ellos diferentes secuencias, es decir, ARNi 1, ARNi 2, ARNi 3, ARNi 4, y ARNi 5 son todos ellos diferentes entre sí. No obstante, los elementos promotores de cualquier cassette pueden ser iguales (es decir, por ejemplo, la secuencia de dos o más de P1, P2, P3, P4 y P5 puede ser la misma); todos los promotores dentro de cualquier cassette pueden ser diferentes entre sí o puede haber una combinación de elementos promotores representada solamente una vez, y elementos promotores representados dos veces o más dentro de cualquier cassette. De manera similar, los elementos de finalización de cualquier cassette pueden ser los mismos (por ejemplo, la secuencia de dos o más de T1, T2, T3, T4, y T5 puede ser la misma, tal como tramos contiguos de cuatro o más residuos T); todos los elementos finalizadores dentro de un cassette pueden ser diferentes entre sí, o puede haber una combinación de elementos de finalización representados solamente una vez, y elementos de finalización representados dos veces o más dentro de cualquier cassette. Preferentemente, los elementos promotores y elementos de finalización de cada componente promotor/ARNi/finalizador que comprenden cualquier cassette, son todos ellos diferentes, para disminuir la probabilidad de eventos de recombinación de ADN entre componentes y/o cassettes. Además, en una realización preferente, el elemento promotor y el elemento de terminación utilizados en cada componente promotor/ARNi/finalizador se hacen corresponder entre sí; es decir, los elementos promotor y finalizador se toman del mismo gen, en el que tienen lugar de manera natural.

Las figuras 3A, 3B, y 3C muestran múltiples constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple que comprenden realizaciones alternativas de cassettes de expresión de ARNi de promotor múltiple que expresan ARNsh cortos. Los ARNsh son duplex cortos, en los que las cadenas de sentido y antisentido están enlazadas por un bucle de horquilla. Una vez expresados, los ARNsh son procesados en especies de ARNi. Las casillas A, B y C representan tres elementos promotores diferentes, y las flechas indican la dirección de transcripción. TERM 1, TERM 2, y TERM 3 representan tres secuencias de terminación distintas, y ARNsh-1, ARNsh-2 y ARNsh-3 representan tres especies de ARNsh distintas. Los cassettes de expresión de ARNi de promotor múltiple en las realizaciones indicadas se extienden desde la casilla marcada A a la casilla marcada Term 3. La figura 3A muestra cada uno de los componentes (20) de promotor/ARNi/finalizador en la misma orientación dentro del cassette, mientras que la figura 3B muestra los componentes promotor/ARNi/finalizador para ARNsh-1 y ARNsh-2 en una orientación, y el componente promotor/ARNi/finalizador para ARNsh-3 en la orientación opuesta (es decir, la transcripción tiene lugar en ambas cadenas del cassette).

La figura 3C muestra cada uno de los cassettes separados por una región de ADN para incrementar la distancia entre componentes de promotor/ARNi/finalizador. El ADN insertado, conocido como ADN de relleno ("stuffer")

pueden tener cualquier longitud comprendida entre 5 y 5000 nucleótidos. Puede haber uno o varios fragmentos de relleno entre promotores. En el caso de múltiples fragmentos de relleno, pueden ser de igual o distinta longitud. Los fragmentos de ADN de relleno son preferentemente secuencias distintas. Los fragmentos de ADN de relleno pueden ser utilizados para incrementar las dimensiones de cassette promotor múltiple de la presente invención a efectos de permitir que encaje, aproximadamente en un vector de suministro correspondiente. La longitud del relleno está dictada por las exigencias de dimensiones del vector específico asociado al cassette promotor múltiple. Por ejemplo, en una realización, los fragmentos de relleno son un total de 4000 nucleótidos (nt) para cumplir apropiadamente con las exigencias de dimensiones del vector AAV. En otra realización, los fragmentos de relleno totalizan 2000 nt a efectos de cumplir de manera apropiada las exigencias de dimensiones del vector AAV complementario. También se pueden utilizar otras variantes.

Las figuras 3D y 3E muestran múltiples constructos de expresión de ARNi de promotores múltiples que comprenden realizaciones alternativas de cassettes de expresión de ARNi de promotor múltiple, que expresan especies de ARNi sin un bucle de horquilla. En ambas figuras P1, P2, P3, P4, P5 y P6 representan elementos promotores (con flechas indicativas de la dirección de transcripción), y T1, T2, T3, T4, T5 y T6 representan elementos de terminación. También, en ambas figuras ARNi 1 sentido y ARNi 1 antisentido (a/s) son complementos, ARNi 2 sentido y ARNi 2 a/s son complementos, y ARNi 3 sentido y ARNi 3 a/s son complementos.

En la realización mostrada en la figura 3D las tres secuencias de ARNi sentido son transcritas desde una cadena (con intermedio de P1, P2, y P3), mientras que las tres secuencias ARNi a/s son transcritas de la cadena complementaria (con intermedio de P3, P5 y P6). En esta realización específica, el elemento de finalización de ARNi 1 a/s (T4) queda dentro del promotor P1 y la secuencia de ARNi 1 sentido, mientras que el elemento de terminación de ARNi 1 sentido (T1) queda dentro de la secuencia ARNi 1 a/s y su promotor, P4. Este motivo se repite de manera que si la cadena superior, mostrada en la figura 3D, se designa cadena (+) y la cadena inferior se designa cadena (-), los elementos que se encuentran desplazándose izquierda a derecha sería P1 (+), T4 (-), ARNi 1 (sentido y a/s), T1 (+), P4 (-), P2 (+), T5 (-), ARNi 2 (sentido y a/s), T2 (+), P5 (-), P3 (+), T6 (-), ARNi 3 (sentido y a/s), T3 (+), y P6 (-).

En una realización alternativa, mostrada en la figura 3E, todas las secuencias sentido y antisentido ARNi son transcritas desde la misma cadena. Un técnico en la materia apreciará que cualquiera de las realizaciones de los cassettes de expresión ARNi de promotor múltiple, mostrados en las figuras 3A a 3E, se pueden utilizar para ciertas aplicaciones, así como combinaciones o variaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, se pueden utilizar promotores de longitud variable. Por ejemplo, la utilización de tres o más promotores fuertes (tales como un promotor de tipo Pol III) pueden comprometer la célula, por ejemplo, agotando la reserva de nucleótidos disponibles u otros componentes celulares necesarios para transcripción. De manera adicional o alternativa, la utilización de varios promotores fuertes, puede provocar un nivel tóxico de expresión de agentes ARNi en la célula. De este modo, en algunas realizaciones, uno o varios de los promotores del cassette pueden expresar agentes de ARNi a menos de una tasa máxima. Los promotores pueden ser también modificados o no, utilizando técnicas moleculares o de otro tipo, por ejemplo, mediante elementos de regulación para conseguir niveles más débiles de transcripción.

Los promotores pueden ser específicos de tejidos o específicos de células. El término “específico de tejidos”, que se aplica a un promotor, se refiere a un promotor que es capaz de dirigir la expresión selectiva de una secuencia de nucleótidos de interés a un tipo específico de tejido (por ejemplo, hígado) en la ausencia relativa de expresión de la misma secuencia de nucleótidos de interés en un tipo distinto de tejido (por ejemplo, cerebro). Estos promotores específicos de tejidos, incluyen promotores, tales como lck, miogenina, o thy1. El término específico de “células específicas” aplicado a un promotor se refiere a un promotor que es capaz de dirigir expresión selectiva de una secuencia de nucleótidos de interés a un tipo específico de célula en ausencia relativa de expresión de la misma secuencia de nucleótidos de interés en un tipo diferente de célula dentro del mismo tejido (ver, por ejemplo, Higashibata, y otros, J. Bone Miner. Res. Jan 19 (1): 78-88 (2004); Hoggatt, y otros, Circ. Res., Dec. 91 (12): 1151-59 (2002); Sohal, y otros, Circ. Res. Jul 89 (1): 20-25 (2001); y Zhang, y otros, Genome Res. Jan 14 (1): 79-89 (2004)). El término “específico de células” cuando se aplica a un promotor, significa también un promotor capaz de promover expresión selectiva de una secuencia de nucleótidos de interés en una región dentro de un tejido único. De manera alternativa, los promotores pueden ser constitutivos o regulables. Adicionalmente, los promotores pueden ser modificados a efectos de poseer diferentes especificidades.

El término “constitutivo” cuando se hace referencia a un promotor significa que el promotor es capaz de dirigir la transcripción de una secuencia de ácido nucleico enlazada de manera operativa en ausencia de estímulo (por ejemplo, shock térmico, agentes químicos, luz, etc.). De manera típica, los promotores constitutivos son capaces de dirigir la expresión de una secuencia de codificación sustancialmente en cualquier célula y en cualquier tejido. Los promotores utilizados para transcribir las especies de ARNi son, preferentemente, promotores constitutivos, tal como promotores para ubiquitina, CMV, β -actina, H4 histona, EF-1 alfa o genes pgk, controlados por ARN polimerasa II, o elementos promotores controlados por ARN polimerasa I. En realizaciones preferentes, se utilizan elementos promotores controlados por ARN polimerasa III, tales como promotores U6 (U6-1, U6-8, U6-9), promotor H1, 7SL,

promotores humanos Y (hY1, hY3, hY4 (ver Maraia, y otros, *Nucleic Acids Res* 22 (15): 3045-52 (1994)) y hY5 (ver Maraia, y otros, *Nucleic Acids Res* 24 (18): 3552-59 (1994)), promotor humano MRP-7-2, promotor adenovirus VA1, promotores humanos ARNt, promotores ARN ribosomales 5s, así como híbridos funcionales y combinaciones de cualesquiera de estos promotores.

5 De manera alternativa, en algunas realizaciones puede ser óptimo el seleccionar promotores para permitir la expresión inducible de las especies de ARNi. Se conocen en la técnica una serie de sistemas para la expresión inducible, utilizando dichos promotores, incluyendo, sin que ello sea limitativo, el sistema de respuesta de tetraciclina y el sistema lac operador-represor (ver WO 03/022052 A1; y US 2002/0162126 A1), el sistema regulado por ecdisona, o promotores regulados por glucocorticoides, progestinas, estrógeno, RU-486, esteroides, hormonas del tiroides, AMP cíclico, citokinas, reguladores de la familia del calciferol, o promotor de iones metálicos (regulado por metales inorgánicos).

15 Uno o varios potenciadores pueden encontrarse también presentes en el constructo de expresión de ARNi de promotor múltiple vírico para incrementar la expresión del gen de interés. Los potenciadores apropiados para su utilización en realizaciones de la presente invención incluyen el potenciador Apo E HCR, el potenciador CMV que ha sido descrito recientemente (ver, Xia y otros, *Nucleic Acids Res* 31-17 (2003)), y otros potenciadores conocidos por los técnicos en la materia.

20 En una realización de esta invención, se pueden añadir elementos potenciadores ApoE al cassette de promotor múltiple de la presente invención. El potenciador ApoE es un elemento potenciador de aproximadamente 155 pares de bases (bp), derivado de apolipoproteína E o ApoE. Una o varias copias del potenciador ApoE pueden ser añadidas más arriba o más abajo del primer, segundo y/o tercer promotores (o más arriba o más abajo de más de tres promotores en caso de que existan) en el cassette de promotor múltiple de esta invención. El promotor ApoE es una apolipoproteína que media en la unión, internalización y catabolismo de partículas de lipoproteínas y que es un ligando para el receptor de lipoproteína de baja densidad (ApoB/E) y para el receptor ApoE de tejidos hepáticos. El potenciador genético asociado con el gen ApoE es un elemento de control eucariótico que puede incrementar la transcripción de un ácido nucleico, específicamente en el hígado. El potenciador ApoE puede estar localizado hasta 2000 nucleótidos más arriba o más debajo de un promotor específico para el hígado, y puede encontrarse presente con una o varias copias.

35 Las secuencias de ARNi codificadas por los cassettes de expresión de ARNi de promotor múltiple de la presente invención, tienen como resultado la expresión de ARNs de interferencia pequeños, que son ARNs de doble cadena, cortos, que no son tóxicos en células de mamíferos. No hay limitación específica en la longitud de las especies de ARNi de la presente invención siempre que no muestren toxicidad celular. Los ARNi pueden tener una longitud, por ejemplo, de 15 a 49 bp, preferentemente una longitud de 15 a 35 bp, y más preferentemente de 19 a 29 bp. Las partes de ARN de doble cadena de los ARNi pueden ser completamente homólogas o pueden contener porciones no apareadas, debido a desequilibrio de la secuencia (los nucleótidos correspondientes de cada cadena no son complementarios) abultadas (bulge) (falta de nucleótido complementario correspondiente en una cadena), y similares. Estas partes no apareadas pueden ser toleradas en la medida de que no interfieren significativamente con la formación o eficacia de ARNi duplex.

45 Los términos de una especie de ARNi, de acuerdo con la presente invención pueden ser romos o cohesivos (en voladizo) siempre que el ARNi reduzca a silencio de manera efectiva el gen diana. La estructura extrema cohesiva (en voladizo) no está limitada solamente a una prolongación 3', sino que una estructura de prolongación 5' puede estar incluida siempre que el ARNi resultante sea capaz de inducir el efecto ARNi. Además, el número de nucleótidos en voladizo puede ser de cualquier número siempre que el ARNi resultante es capaz de inducir efecto ARNi. Por ejemplo, si se encuentra presente, la prolongación puede consistir en 1 a 8 nucleótidos, preferentemente consiste en 2 a 4 nucleótidos.

50 La especie de ARNi, utilizada en la presente invención, puede tener un precursor estructurado en forma de tallo-bucle ("stem-loop") (ARNsh) en el que los extremos del ARN de doble cadena están conectados mediante un ARN enlazador de cadena única. La longitud de la parte de bucle del ARNsh de cadena única puede ser de 5 a 20 bp, preferentemente de 5 a 9 bp.

55 Cualquier secuencia de ácido nucleico transcrita puede ser diana para cassettes de expresión de ARNi de promotor múltiple. Son dianas probables para ARNi genes, tales como genes de desarrollo (developmental), sin que ello sea limitativo, (por ejemplo, moléculas de adhesión, inhibidores de ciclina cinasa, miembros de la familia Wnt, miembros de la familia Pax, miembros de la familia de hélice con aletas ("Winged"), miembros de la familia Hox, citokinas/linfocinas y sus receptores, factores de crecimiento/diferenciación y sus receptores, neurotransmisores y sus receptores); oncógenos (por ejemplo, ABL1, BCL1, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSF1 R, ERBA, ERBB, EBRB2, ETS1, ETS1, ETV6, FGR, FOS, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS, PIM1, PML, RET, SRC, TAL1, TCL3, y YES); genes supresores de tumores (por ejemplo, APC, BRCA1, BRCA2, MADH4, MCC, NF1, NF2, RB1, TP53, y WT1); y enzimas (por ejemplo, ACC sintasa y oxidasa, ACP de saturasas e hidroxilasas, ADP glucosa fosforilasas, ATPasas, alcohol de hidrogenasas, amilasas,

amiloglucosidasas, catalasas, celulasas, chalcon sintasas, quitinasas, ciclooxigenasas, decarboxilasas, dextrinasas, ADN y ARN polimesasas, galactosidasas, glucanasas, glicosasoxidasas, sintasas de almidón unidas a gránulos, GTPasas, helicasas, hemicelulasas, integrasas, inulinasas, invertasas, isomerasas, quinasas, lactasas, lipasas, lipoxigenasas, lisocimas, nopalina sintasas, octopina sintasas, pectinaesterasas, peroxidasas, fosfatadas, fosfolipidasas, fosforilasas, fitasas, sintasas reguladores del crecimiento de plantas, poligalactorunasas, proteinasas y peptidasas, pulanasas, recombinasas, transcriptasas inversas, RUBISCOs, topoisomerasas, y xylanadas); genes estructurales víricos, tales como proteínas de cápsidos y envoltentes; genes bacterianos, tales como los involucrados en replicación o características desestructurales, o genes de otros patógenos involucrados en replicación o características estructurales. Además, los cassettes de expresión de ARNi de promotor múltiple de la presente invención pueden ser utilizados para proponerse como diana, secuencias específicas que son únicas a alelos, responsables de la patología en enfermedades autosomales dominantes, tales como SCA, alelo responsable de la enfermedad de Huntington, o los alelos de genes de colágeno, responsables de osteogénesis imperfecta. Un importante aspecto de la invención es que las infecciones víricas eliminadas por ARNi pueden no resultar en daño alguno para las células infectadas (Gitlin, y otros Nature 418: 430-434 (2002)). Esta característica de la presente invención la distingue con respecto a métodos de la técnica anterior, en los que la eliminación de virus de células principales de mamíferos provoca la destrucción de las células infectadas, por acción del sistema inmune o por apoptosis inducida por el virus (Guidotti y otros/. Annu. Rev. Immunol. 19: 65-91 (2001)). Por lo tanto, este aspecto de la invención proporciona un agente ARNi efectivo con eliminación vírica nocitopática.

Las secuencias para la especie ARNi son seleccionadas basándose en la secuencia genética de la secuencia de ácido nucleico diana, y preferentemente se basa en regiones de secuencias de ácido nucleico diana que se han conservado. Por ejemplo, en el caso de seleccionar secuencias de ARNi para tratar una infección vírica o para construir una vacuna de ARNi, las secuencias escogidas son preferentemente las conservadas entre especies, o incluso subespecies del virus. Dado que se sabe que los virus mutan rápidamente, la selección de las secuencias conservadas conserva probablemente la eficacia del ARNi a lo largo del tiempo. En el caso de selección de secuencias de ARNi para tratar el cáncer u otras enfermedades, las secuencias son preferentemente las que se han conservado entre variantes de genes u oncogenes.

Los métodos de alineación de secuencias para comparación y selección de secuencias de ARNi son bien conocidos en la técnica. La determinación de identidad porcentual entre dos o más secuencias se puede conseguir utilizando un algoritmo matemático. De modo preferente, son ejemplos no limitativos de dichos algoritmos matemáticos el algoritmo de Myers y Miller (1988), el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988), y el de Karlin y Altschul (1993). Preferentemente, se utilizan implementaciones de ordenador de estos algoritmos matemáticos. Estas implementaciones incluyen, sin que ello sea limitativo, CLUSTAL del programa PC/Gen (disponible de Intelligenetics, Mountain View, Calif); el programa ALIGN (Versión 2.0), GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, Megalign (que utiliza los algoritmos Jotun Hein, Martínez, Needleman-Wunsch), DNASTar Lasergene (ver www.dnastar.com) y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics Software Package, Versión 8 (disponible de Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wis., USA). Las alineaciones que utilizan estos programas se pueden llevar a cabo utilizando los parámetros por omisión ("default parameters") o parámetros seleccionados por el operador. El programa CLUSTAL ha sido bien descrito por Higgins. El programa ALIGN se basa en el algoritmo de Myers y Miller; y los programas BLAST se basan en el algoritmo de Karlin y Altschul. El software para llevar a cabo análisis BLAST se encuentra disponible para el público en el National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para comparación de secuencia, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, a la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen secuencias de prueba y de referencia en un ordenador, se designan las coordenadas de las subsecuencias, si es necesario, y se designan parámetros de programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia calcula entonces la identidad porcentual de la secuencia para la secuencia o secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

De manera típica, la inhibición de las secuencias diana por ARNi requiere un elevado grado de homología de secuencia entre la secuencia diana y la cadena sentido de las moléculas de ARNi. En algunas realizaciones esta homología es superior a 70% aproximadamente, y puede ser superior a 75%, aproximadamente. Preferentemente, la homología es superior a 80% aproximadamente, y es superior a 85%, o incluso 90%. Más preferentemente, la homología de secuencia entre la secuencia diana y la cadena de sentido del ARNi es superior aproximadamente a 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. En realizaciones en las que el constructo de expresión de ARNi de promotor múltiple es utilizado para proponerse infecciones víricas como diana puede ocurrir que la homología de secuencia entre los genomas de las diferentes subespecies del virus, incluso en regiones conservadas, no alcance el nivel superior a 90%, o incluso 80% en 15 a 30 nucleótidos consecutivos. En este caso, la homología de secuencia entre la secuencia diana para alguna subespecies y la cadena sentido del ARNi puede ser de 80% o menos.

Por otra parte, el constructo de expresión de ARNi de promotor múltiple de la presente invención es particularmente útil cuando se proponen como diana genes de organismos que no muestran elevada homología de secuencia en las

especies, subespecies, o variantes, dado que cada especie de ARNi en el cassette de expresión de ARNi de promotor múltiple puede ser utilizada para proponer como diana diferentes partes de los gen o genes, o subconjuntos diana de variantes o subespecies.

5 Además de seleccionar las secuencias de ARNi, basadas en las regiones conservadas de una secuencia objetivo, la selección de las secuencias de ARNi se puede basar en otros factores. A pesar de una serie de intentos para diseñar criterios de selección para identificar secuencias, que serán efectivas, en ARNi basado en características de la secuencia diana deseada (por ejemplo, contenido porcentual de GC, posición desde el codón inicial de traducción, o similitudes de secuencia basadas en una búsqueda en base de datos en una secuencia *in silico* para homólogos del ARNi propuesto, criterios de apareado termodinámico) en la actualidad no es posible predecir con un elevado grado de confianza cuál de las múltiples secuencias de ARNi candidatos correspondientes a una diana deseada elicitarán en realidad una respuesta silenciadora de ARN. En vez de ello, se generan y comprueban, de manera típica, secuencias de polinucleótidos de ARNi candidato específico individual para determinar si se puede elicitarse interferencia con la expresión de una diana deseada.

15 Un problema importante de las terapias antivíricas actuales es la aparición de variantes resistentes, conocidas de manera general como mutantes de escape (Gitlin y otros J. of Virol. 79; 1027-1035, (2005)). Un aspecto de la presente invención neutraliza mutantes de escape emergentes. En algunas realizaciones de esta invención la selección de secuencias de ARNi múltiples para tratar infecciones víricas se basa en la aparición de mutantes de escape de tratamiento de células infectadas con secuencia única de ARNi. Los mutantes de escape emergentes se determinan por tratamiento con un constructo de expresión que contiene una única secuencia de ARNi después de que las células han sido infectadas con un virus. Las células que contienen virus resistentes que aparecen son cosechadas, y los genomas víricos son secuenciados. El secuenciado revela mutaciones predominantes que se presentan para resistir la inhibición vírica. Un constructo de expresión de ARNi de promotor múltiple, según la presente invención, es generado conteniendo secuencias ARNi basadas en la secuencia genética del gen diana, y adicionalmente secuencias de las mutaciones puntuales que se presentan para resistir el tratamiento por ARNi.

20 Tal como se ha indicado, las regiones de codificación de ARNi del cassette de expresión de ARNi de promotor múltiple están operativamente enlazadas por elementos de finalización. En una realización, los finalizadores comprenden tramos de cuatro o más residuos de timidina. En otra realización preferente, los elementos finalizadores utilizados son todos distintos y se corresponden con los elementos del promotor del gen del que se deriva el finalizador. Estos finalizadores incluyen los genes SV40 poly A, el Ad VA1, el gen de ARN ribosomal 5s, y los finalizadores para los ARNs-t humanos. Además, los promotores y finalizadores pueden ser mezclados y equilibrados, tal como se realiza comúnmente con promotores y finalizadores RNA pol II.

35 Además, los cassettes de expresión de ARNi de promotor múltiple se pueden configurar donde están situados estratégicamente lugares de clonación múltiple y/o lugares de restricción única, de manera tal que el promotor, ARNi y elementos finalizadores se puedan eliminar o sustituir fácilmente. Además, los cassettes de expresión de ARNi de promotor múltiple pueden ser ensamblados a partir de componentes oligonucleótidos más pequeños utilizando lugares de restricción estratégicamente situados y/o extremos adhesivos complementarios. El vector base para un sistema, de acuerdo con realizaciones de la presente invención, consiste en un plásmido con un multienlazador, en el que todos los sitios son únicos (aunque ésta no es una exigencia absoluta). Secuencialmente, cada promotor es insertado entre sus lugares designados como únicos, resultando en un cassette base con tres promotores o más, todos los cuales pueden tener orientación variable. Normalmente, de forma secuencial, pares de cebadores reasociados son insertados en los lugares únicos, más abajo de cada uno de los promotores individuales, resultando en un constructo de cassette de expresión triple. El inserto puede ser desplazado, por ejemplo, a un núcleo ("backbone") de AAV, utilizando dos lugares de enzimas únicos (iguales o distintos) que flanquean el inserto del cassette de expresión triple.

50 En la etapa 300 de la figura 1, los cassettes de expresión de ARNi de promotor múltiple están ligados a un vector de suministro. Los constructos en los que se inserta el cassette de expresión de ARNi de promotor múltiple y son utilizados para transducción y expresión de alta eficacia de los agentes de ARNi en varios tipos de células, se derivan preferentemente de virus, y son compatibles con el suministro vírico. La generación del constructo se puede conseguir utilizando cualquier técnica de ingeniería genética adecuada, bien conocida en esta técnica, incluyendo, sin que ello sea limitativo, las técnicas estándar de PCR, síntesis de oligonucleótidos, digestión de endonucleasas de restricción, ligado, transformación, purificación de plásmido, y secuenciado de ADN. El constructo comprende, preferentemente, por ejemplo, secuencias necesarias para empaquetar el constructo de expresión de ARNi de promotor múltiple en partículas víricas, y/o secuencias que permiten la integración del constructo de expresión de ARNi de promotor múltiple en el genoma de la célula diana. El constructo vírico puede contener también genes que permiten la replicación y propagación del virus, aunque en realizaciones preferentes estos genes serán suministrados *in trans*. De manera adicional, el constructo vírico puede contener genes o secuencias genéticas procedentes del genoma de cualquier organismo conocido, incorporado en forma natural, o modificado. Por ejemplo, el constructo vírico preferente comprende secuencias útiles para replicación del constructo en bacterias.

El constructo también contiene elementos genéticos adicionales. Los tipos de elementos, que pueden ser incluidos en el constructo, no están limitados de modo alguno y pueden ser escogidos por un técnico en la materia. Por ejemplo, los elementos genéticos adicionales pueden incluir un gen indicador, tal como uno o varios genes para una proteína marcadora fluorescente, tal como GFP o RFP; una enzima fácilmente ensayada, tal como beta-galactosidasa, luciferasa, beta-glucoronidasa, cloranfenicol acetil transferasa o fosfatasa alcalina embrionaria segregada, o proteínas para las que se dispone fácilmente de inmunoensayos, tales como hormonas o citocinas. Otros elementos genéticos, que pueden ser utilizables en realizaciones de la presente invención, incluyen los que codifican proteínas que confieren una ventaja de crecimiento selectiva en células tales como adenosina deaminasa, fosfotransferasa amiglicódica, dihidrofolato reductasa, higromicina-B-fosfotransferasa, o las que codifican para proteínas que proporcionan una capacidad biosintética faltante en un auxotrofo. Si se incluye un gen indicador junto con el cassette de expresión de ARNi de promotor múltiple, se puede incluir una secuencia de lugar de entrada ribosomal interna (IRES). Preferentemente, los elementos genéticos adicionales están enlazados operativamente con un promotor/potenciador independiente, y controlados por el mismo.

Un sistema de suministro vírico basado en cualquier virus apropiado, puede ser utilizado para suministrar los constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple de la presente invención. Además, se pueden utilizar sistemas víricos híbridos. La elección del sistema de suministro vírico dependerá de varios parámetros, tales como el tejido diana para suministro, la eficacia de transducción del sistema, patogenicidad, preocupaciones inmunológicas y de toxicidad, y similares. Dada la diversidad de dianas de enfermedad que se pueden relacionar con interferencia por los constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple de la presente invención, es evidente que no existe un sistema vírico único adecuado para todas las aplicaciones. Cuando se selecciona un sistema de suministro vírico a utilizar en la presente invención, es importante escoger un sistema en el que partículas víricas que contienen constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple sean preferentemente: 1) propagadas de manera reproducible y de forma estable; 2) capaces de ser purificadas a elevadas concentraciones, y 3) capaces de mediar suministro objetivado (suministro de constructo de expresión de ARNi de promotor múltiple a los tejidos u órganos de interés sin diseminación generalizada); 4) capaces de ser expresados en forma constitutiva o regulable.

En general, las cinco clases de sistemas víricos más habitualmente utilizadas en terapia de genes, pueden ser categorizadas en dos grupos, de acuerdo con el hecho de que sus genomas se integran en cromatinas de las células huéspedes (oncoretrovirus y lentivirus), o persisten en el núcleo de la célula predominantemente como episomas extracromosómicos (virus adeno-asociados, adenovirus y herpesvirus). Esta distinción es un determinante importante de la adecuación de cada vector para aplicaciones específicas; los vectores no integrantes pueden mediar, en ciertas circunstancias, la expresión persistente de genes en células no proliferantes, pero los vectores integrantes son las herramientas preferentes si se debe mantener una alteración genética estable en células en división.

Por ejemplo, en una realización de la presente invención, se utilizan virus procedentes de la familia Parvoviridae. La familia Parvoviridae es una familia de virus con ADN pequeño, no envuelto, de cadena única con genomas de 5000 nucleótidos aproximadamente. Se incluyen entre los miembros de ésta familia, los virus adeno-asociados (AAV), un parvovirus dependiente que, por definición, requiere coinfección con otro virus (típicamente un adenovirus o herpesvirus) para iniciar y mantener un ciclo infeccioso productivo. En ausencia de dicho virus helper, el AAV es todavía competente para infectar o transducir una célula diana por unión mediada por receptor e internalización, penetrando en el núcleo en las células, tanto sin división como células con división.

Una vez en núcleo, el virus se descubre y el transgén es expresado a partir de una serie de diferentes formas de las que la más persistente son los monómeros circulares. El AAV se integrará en el genoma de 1-5% de células que son transducidas de manera estable (Nakai, y otros, J. Virol. 76: 11343-349 (2002). La expresión del transgén puede ser excepcionalmente estable, y en un estudio con suministro AAV de factor IX, modelo de perro continúa expresando niveles terapéuticos de la proteína 5,0 años después de una única infusión directa con el virus. Dado que no se produce virus de progenie por una infección de AAV en ausencia de virus helper, la magnitud de la transducción queda limitada solamente a las células iniciales que son infectadas con el virus. Es esta característica la que hace el AAV un vector de terapia de gen preferente para la presente invención. Además, a diferencia de retrovirus, adenovirus, y virus de herpes simplex, el AAV parece carecer de patogenicidad y toxicidad humana (Kay, y otros, Nature. 424: 251 (2003) y Thomas, y otros, Nature Reviews, Genetics 4: 346-58 (2003)).

De manera típica, el genoma de AAV contiene solamente dos genes. El gen "rep" codifica, como mínimo, cuatro proteínas separadas utilizadas en replicación de ADN. El producto de gen "cap" es desdoblado de forma diferencial para generar las tres proteínas que comprenden el cápsido del virus. Cuando se empaqueta el genoma en virus naciente, solamente las Repeticiones Terminales Invertidas (ITR) son secuencias obligadas; se pueden cancelar rep y cap del genoma, y se pueden sustituir con secuencias heterólogas escogidas. No obstante, a efectos de producir las proteínas necesarias para replicar y empaquetar el constructo heterólogo basado en AAV en un virión naciente, las proteínas rep y cap deben ser dispuestas *in trans*. Las funciones helper, proporcionadas normalmente por coinfección con el virus helper, tal como adenovirus o herpesvirus que se han mencionado anteriormente, pueden ser proporcionadas también *in trans* en forma de uno o varios plásmidos de expresión de ADN. Dado que el genoma

codifica normalmente solo dos genes, no es sorprendente que como vehículo de suministro, el AAV esté limitado por una capacidad de empaquetado de 4,5 kilobases de cadena única (kb). No obstante, si bien esta restricción de dimensión puede limitar los genes que pueden ser suministrados para terapias de genes de sustitución, no afecta de manera adversa al empaquetado y expresión de secuencias más cortas, tales como ARNi.

5 La utilidad de AAV para aplicaciones ARNi ha sido demostrada en experimentos en los que se ha utilizado AAV para suministrar ARNsh *in vitro* para inhibir la expresión de p53 y Caspasa 8 (Tomar y otros, Oncogene. 22: 5712-15 (2003)). Después del clonado de secuencias apropiadas en un vector AAV-2 ("guttet"), se generaron viriones infecciosos de AAV en células HEK293 y se utilizaron para infectar células HeLa S3. Una disminución dependiente de dosis de niveles de Caspasa 8 endógena y p53, quedó demostrada. Boden y otros, también utilizaron AAV para suministrar ARNsh *in vitro* para inhibir replicación de VIH en sistemas de cultivo de tejidos (Boden, y otros, J. Virol. 77 (21): 115231-35 (2003)), evaluado por producción de p24 en el medio agotado.

15 No obstante, se deben afrontar inconvenientes técnicos cuando se utiliza AAV como vehículo para constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple. Por ejemplo, diferentes porcentajes de población humana pueden poseer anticuerpos neutralizantes contra ciertos serotipos de AAV. No obstante, dado que existen varios serotipos de AAV, en algunos de los cuales el porcentaje de individuos que presentan anticuerpos neutralizantes es muy reducido, se pueden utilizar otros serotipos o se puede utilizar seudotipados. Existen, como mínimo, ocho serotipos diferentes que han sido caracterizados, con docenas de otros que han sido aislados, pero que no han sido bien descritos. Otra limitación es que como resultado de una posible respuesta inmune a AAV, solamente se puede administrar una vez la terapia basada en AAV; no obstante, la utilización de serotipos derivados, no humanos, alternativos, puede permitir administraciones repetidas. La ruta de administración, serotipo y composición del genoma suministrado influye en la especificidad de los tejidos.

25 Otra limitación, utilizando sistemas de AAV sin modificar con constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple es que la transducción puede ser ineficaz. La transducción estable *in vivo* puede estar limitada a 5-10% de células. No obstante, se da a conocer diferentes métodos en la técnica para aumentar los niveles estables de transducción. Un sistema consiste en utilizar el seudotipado, en el que genomas de AAV-2 son empaquetados, utilizando proteínas cap derivadas de otros serotipos. Por ejemplo, sustituyendo el gen AAV-5 cap por su contrario AAV-2, Mingozzi y otros incrementaron la transducción estable hasta aproximadamente 15% de hepatocitos (Mingozzi, y otros, J. Virol. 76 (20): 10497-502 (2002)). Thomas y otros han transducido más de 30% de hepatocitos de ratón *in vivo* utilizando el gen cápsido de AAV8 (Thomas, y otros, J. Virol. en publicación). Grimm y otros, (Blood. 2003-02-0495) han seutipado exhaustivamente AAV-2 con AAV-1, AAV-3B, AAV-4, AAV-5, y AAV-6 para estudios de cultivo de tejidos. Los niveles más elevados de expresión transgenes fueron inducidos por viriones que habían sido seudotipados con AAV-6, produciendo casi 2000% de expresión transgén más elevada que AAV-2. De este modo, la presente invención prevé la utilización de un virus AAV seudotipado para conseguir elevados niveles de transducción con un incremento correspondiente en la expresión de los constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple.

40 Otro sistema de suministro vírico utilizable con los constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple, según la presente invención, es un sistema basado en virus de la familia Retroviridae. Los retrovirus comprenden virus de animales con ARN de cadena única, que se caracterizan por dos peculiaridades únicas. En primer lugar, el genoma de un retrovirus es diploide, consistiendo en dos copias del ARN. En segundo lugar, este ARN es transcrito por la transcriptasa inversa de enzima, asociada a virión, pasando a ADN de doble cadena. Este ADN de doble cadena o provirus, puede integrarse entonces, en el genoma principal y puede pasar de la célula parental a células progenie como componente integrado de forma estable del genoma huésped.

50 En algunas realizaciones, los lentivirus son los miembros preferentes de la familia de retrovirus para su utilización en la presente invención. Los vectores de lentivirus son frecuentemente seudotipados con glicoproteína de virus de esteatitis vesiculares (VSV-G), y se han derivado de virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA); visan-maedi, que provoca encefalítis (visna) o neumonía en ovejas; virus de anemia infecciosa equina (EIAV), que provoca anemia hemolítica autoinmune y encefalopatía en los caballos; virus de inmunodeficiencia felina (FIV), que provoca deficiencia inmune en gatos; virus de inmunodeficiencia bovina (BIV), que provoca limfadenopatía y limfocitosis en el ganado; y virus de inmunodeficiencia de simios (SIV), que provoca deficiencia inmune y encefalítis en primates no humanos. Los vectores basados en (VIH) retienen <5% del genoma parental, y <25% del genoma se incorpora en constructos de empaquetado, lo que minimiza la posibilidad de la generación de VIH de inversión competente en replicación. La bioseguridad ha sido incrementada además, por un desarrollo de vectores autoinactivantes que contienen deleciones de los elementos reguladores en la secuencia de repetición del terminal largo de la parte descendente, eliminando la transcripción de la señal de empaquetado que se requiere para movilización del vector.

60 La transcripción inversa del genoma de ARN retrovítico tiene lugar en el citoplasma. A diferencia de los retrovirus de tipo C, el ADNc lentivítico en complejos con otros factores víricos conocidos como complejo de preiniciación, es capaz de translocación a través de la membrana celular y transduce células sin división. Una característica estructural del flap viral ADNc-ADNa parece que contribuye a una importación nuclear eficiente. Este flap depende de la integridad del tracto central de polipurina (cPPT) que está situado en el gen viral de polimerasa, de manera que

la mayor parte de vectores derivados de lentivíricos retienen esta secuencia. Los lentivirus tienen un tropismo amplio, bajo potencial inflamatorio, y tienen como resultado un vector integrado. Las limitaciones principales son que la integración puede inducir oncogénesis en algunas aplicaciones. La ventaja principal de la utilización de vectores lentivíricos es que la transferencia de genes es persistente en la mayor parte de tejidos o tipos de células.

5 Un constructo basado en lentivíricos utilizado para expresar los agentes ARNi comprende, preferentemente, secuencias desde las repeticiones terminales en 5' y 3' (LTR) de un lentivirus, más preferentemente el constructo vírico comprende un 3' LTR inactivado o autoinactivante, procedente de un lentivirus. El 3' LTR puede ser hecho autoinactivante por cualquier método conocido en esta técnica. En una realización preferente, el elemento U3 del 3' LTR contiene una delección de su secuencia amplificadora, preferentemente la casilla TATA, lugares Sp1 and NF-kappa B. Como resultado del 3' LTR autoinactivante, el provirus que está integrado en el genoma huésped comprenderá un 5' LTR inactivado. Las secuencias LTR pueden ser secuencias LTR procedentes de cualquier lentivirus de cualquier especie. El constructo basado en lentivirus puede incorporar también secuencias para MMLV o MSCV, RSV o genes de mamíferos. Además, la secuencia U3 del 5' LTR lentivírico se puede sustituir por una secuencia promotora en el constructo vírico. Esto puede incrementar la concentración virus recuperado de la línea celular de empaquetado. También se puede incluir una secuencia amplificadora.

También se puede utilizar otros sistemas víricos o no víricos conocidos por los técnicos en la materia para suministrar los cassettes de expresión de ARNi de promotor múltiple de la presente invención a células de interés, incluyendo, sin que ello sea limitativo, vectores adenovirus-transposon con genes deleccionados que mantienen de manera estable transgenes codificados por virus *in vivo* mediante integración en células huéspedes (ver Yant, y otros, Nature Biotech. 20: 999-1004 (2002)); sistemas derivados de virus Sindbis o Semliki forest (ver Perri, y otros, J. Virol. 74 (20): 9802-07 (2002)); sistemas derivados de virus de la enfermedad de Newcastle disease o virus Sendai; o vectores de ADN mini-círculo carentes de secuencias de ADN bacteriano (ver Chen, y otros, Molecular Therapy. 8 (3): 495-500 (2003)). El AND mini-círculo, tal como se describe en la publicación U. S. N° 2004/0214329 da a conocer vectores que proporcionan elevados niveles persistentes de transcripción de ácido nucleico. Los vectores circulares se caracterizan por carecer de secuencias bacterianas silenciadoras de expresión, y pueden incluir una secuencia o producto de recombinación específica del lugar, unidireccional, además de un cassette de expresión.

30 Además, se pueden utilizar sistemas víricos híbridos para combinar propiedades útiles de dos o más sistemas víricos. Por ejemplo, la maquinaria de integración específica del lugar de AAV de tipo natural se puede acoplar con la internalización eficiente y características de direccionado nuclear del adenovirus. El AAV en presencia de adenovirus o herpesvirus sufre un ciclo de replicación productivo; no obstante, en ausencia de funciones helper, el genoma de AAV se integra en un lugar específico en el cromosoma 19. La integración del genoma de AAV requiere expresión de la proteína AAV rep. Al ser deleccionados vectores AAV convencionales para todos los genes víricos, incluyendo rep, no son capaces de integrarse específicamente en el cromosoma 19. No obstante, esta característica puede ser explotada en un sistema híbrido apropiado. Además, se pueden utilizar elementos genéticos no víricos para conseguir características deseadas en un sistema de suministro vírico, tal como elementos genéticos que permiten recombinación específica del lugar.

40 En la etapa 400 de la figura 1, el constructo de expresión de ARNi de promotor múltiple está empaquetado en partículas víricas. Cualquier método conocido en la técnica anterior puede ser utilizado para producir partículas víricas infecciosas, cuyo genoma comprende una copia del constructo de expresión de ARNi de promotor múltiple. Las figuras 4A y 4B muestran métodos alternativos para empaquetar los constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple de la presente invención en partículas víricas para su suministro. El método de la figura 4A utiliza células de empaquetado que expresan de manera estable *in trans* las proteínas víricas que se requieren para la incorporación del constructo de expresión de ARNi de promotor múltiple en partículas víricas, y también las otras secuencias necesarias o preferentes para un sistema de suministro vírico específico (por ejemplo, secuencias necesarias para replicación, proteínas estructurales y conjuntos víricos) y ligando derivados víricos o artificiales para entrada en tejidos. En la figura 4A un cassette de expresión de ARNi de promotor múltiple está ligado a un vector de suministro vírico (etapa 300), y el constructo de expresión de ARNi de promotor múltiple vírico resultante es utilizado para transfectar células de empaquetado (etapa 410). Las células de empaquetado replican, a continuación, secuencias víricas, expresan proteínas víricas y empaquetan los constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple víricos en partículas víricas infecciosas (etapa 420). La línea celular de empaquetado puede ser cualquier línea celular capaz de expresar proteínas víricas, incluyendo, sin que ello sea limitativo, 293, HeLa, A549, PerC6, D17, MDCK, BHK, bing cherry, phoenix, Cf2Th, o cualquier otra línea conocida por los técnicos en la materia o desarrollada por los mismos. Una célula de empaquetado se describe, por ejemplo, en la patente U. S. N° 6,218, 181.

60 De manera alternativa, una línea celular que no expresa establemente proteínas víricas necesarias puede ser cotransfectada con dos o más constructos para conseguir producción eficiente de partículas funcionales. Uno de los constructos comprende el constructo de expresión de ARNi de promotor múltiple, y el otro plásmido o plásmidos comprenden ácidos nucleicos que codifican las proteínas necesarias para permitir que las células produzcan virus funcionales (constructo de replicación y empaquetado), así como otras funciones helper. El método mostrado en la figura 4B utiliza células para empaquetado que no expresan establemente replicación vírica y genes de

empaquetado. En este caso, el constructo de expresión de ARNi promotor está ligado al vector de suministro vírico (etapa 300) y, a continuación, es cotransfectado con uno o más vectores que expresan las secuencias víricas necesarias para replicación y producción de partículas víricas infecciosas (etapa 430). Las células replican secuencias víricas, expresan proteínas víricas y empaquetan los constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple víricos en partículas víricas infecciosas (etapa 420).

La línea celular de empaquetado o constructo de replicado y empaquetado puede no expresar productos de gen envolvente. En estas realizaciones, el gen que codifica el gen envolvente puede ser facilitado en un constructo separado, que es cotransfectado con el constructo de expresión de ARNi de promotor múltiple. Dado que la proteína envolvente es responsable, en parte, del rango huésped de las partículas víricas, los virus pueden ser seudotipados. Tal como se ha descrito anteriormente, un virus "seudotipado" es una partícula vírica que tiene una proteína envolvente que procede de un virus distinto del virus del que se deriva el genoma. Un experto en la materia puede escoger un seudotipo apropiado para el sistema de suministro vírico utilizado y la célula a buscar como objetivo. Además de conferir un rango huésped específico, un seudotipo escogido puede permitir que el virus se concentre en una concentración o titulación muy elevada. Los virus pueden ser, alternativamente, seudotipados con proteínas envolventes ecotrópicas que limitan la infección a una especie específica (por ejemplo, envolventes ecotrópicas permiten la infección de, por ejemplo, células murinas solamente, en las que las envolventes amfotrópicas permiten la infección, por ejemplo, de células humanas y murinas). Además, los ligandos modificados genéticamente pueden ser utilizados para direccionado específico de células, tales como la asialoglicoproteína para hepatocitos, o transferrina para unión mediada por receptor.

Después de producción en una línea celular de empaquetado, las partículas víricas que contienen los cassettes de expresión de ARNi de promotor múltiple son purificados y cuantificados (titulación). Las estrategias de purificación incluyen centrifugación de gradiente de densidad, o, preferentemente, métodos cromatográficos de columna.

Los cassettes de expresión de ARNi de promotor múltiple víricos de la presente invención, son particularmente útiles como agentes terapéuticos para tratar enfermedades o como vacunas para prevenir enfermedades. La introducción de constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple en células cancerosas o tumores, para inhibir la expresión de genes, requerida para mantenimiento del fenotipo carcinogénico/tumorigénico, se da a conocer también en esta descripción. De manera similar, se da a conocer la introducción de los constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple en células infectadas con un patógeno, tal como un virus para inhibir la expresión de gen de uno o varios genes requeridos para mantenimiento del patógeno. Para prevenir una enfermedad u otra patología, se puede utilizar un constructo de expresión de ARNi de promotor múltiple como vacuna para direccionado hacia un gen requerido para inicio o mantenimiento de la enfermedad o patología.

Se pueden utilizar constructos de expresión ARNi de promotor múltiple víricos en el tratamiento de cáncer, incluyendo tumores sólidos y leucemias, incluyendo: apudoma, coristoma, braquioma, síndrome carcinoide maligno, enfermedad cardíaca carcinoide, carcinoma (por ejemplo, de Walker, de células basales, basoescamoso, de Brown-Pearce, ductal, tumor de Ehrlich, *in situ*, Krebs 2, células Merkel, tumor de pulmón de células no pequeñas, mucinosas, célula "oat", papilares, cirróticos, bronquiolares, broncogénicas, células escamosas, y células de transición), desordenes histiocíticos, leucemia (por ejemplo, células B, células mixtas, células nulas, células T, células T crónicas, asociadas a HTLV-II, limfocíticas agudas, limfocíticas crónicas, células madre, y mieloides), histiocitosis maligna, enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, inmunoproliferativo pequeño, plasmacitoma, reticuloendoteliosis, melanoma, condroblastoma, condroma, condrosarcoma, fibroma, fribrosarcoma, tumores de células gigantes, histiocitoma, lipoma, liposarcoma, mesotelioma, mixoxoma, mixosarcoma, osteoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, sinovioma, adenofibroma, adenolinfoma, carcinosarcoma, cordoma, craneofaringioma, disferminoma, hamartoma, mesenquimoma, mesonefloma, miosarcoma, ameloblastoma, cementoma, odontoma, teratoma, timoma, tumor trofoblastico, adenocarcinoma, adenoma, colangioma, colesteatoma, cilindroma, cistoadenocarcinoma, cistoadenoma, tumor celular granuloso, ginandroblastoma, hepatoma, hidradenoma, tumor de células de islotas, tumor de células de Leydig, papiloma, tumor de células Sertoli, tumor de células theca, leiomioma, leiomiosarcoma, mioblastoma, miomas, miosarcoma, rabdomioma, rabdomiosarcoma, ependimoma, ganglioneuroma, glioma, el meduloblastoma, meningioma, neurilemoma, neuroblastoma, neuroepitelioma, neurofibroma, el neuroma, paraganglioma, nonchromaffina paraganglioma, angioqueratoma, hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia, angioma esclerosante, angiomatosis, glomangioma, hemangioendotelio, hemangioma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, linfangioma, limfangiomioma, linfangiosarcoma, feocromocitoma, pinealoma, carcinosarcoma, condrosarcoma, cistosarcoma filoides, fibrosarcoma, hemangiosarcoma, leiomiosarcoma, leukosarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, miosarcoma, mixosarcoma, carcinoma de ovario, rabdomiosarcoma, sarcoma (por ejemplo, de Ewing, experimental, de Kaposi, y células madre), neoplasmas (por ejemplo, de huesos, de seno, de sistema digestivo, colorrectal, de hígado, pancreático, pituitario, testicular, orbital, de cabeza y cuello, de sistema nervioso central, acústico, pélvico, del tracto respiratorio y urogenital), neurofibromatosis y la displasia cervical, y para el tratamiento de otros estados en las que las células se han en inmortalizado o transformado. Además, se podrían utilizar constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple en combinación con otras modalidades de tratamiento, tales como quimioterapia, intervención quirúrgica, crioterapia, hipertermia, radioterapia, y similares.

Un gen involucrado en la replicación de un patógeno, transmisión de un patógeno o mantenimiento de infección, puede ser direccionado por constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple. Estos constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple víricos pueden ser utilizar para tratar células con riesgo de infección por un patógeno (es decir, vacuna) o células que ya han sido infectadas. Los patógenos que pueden ser tratados por constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple comprende virus de las familias de los Parvoviridae (incluyendo Papiloma virus, etc.), Adenoviridae, Herpesviridae (incluyendo herpesvirus 1 a 7), Poxviridae, Hepadnaviridae, Picornaviridae (virus coxsackie A y coxsackie B y ECHOvirus), Calciviridae, Reoviridae, Togaviridae (virus de encefalitis), Flaviviridae (virus de encefalitis), Arenaviridae, Retroviridae, Bunyaviridae, Coronaviridae, Orthomyzoviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae y Filoviridae, bacterias generales, micobacterias, hongos, Falciparum, Triponosoma Schistosoma, y similares.

En la etapa 500 de la figura 1, el constructo expresión de ARNi de promotor múltiple es suministrado a las células a tratar. El constructo expresión de ARNi de promotor múltiple de la presente invención puede ser introducido en células *in vitro* o *ex vivo* y, a continuación, situado en un animal para llevar a cabo terapia o administrado directamente a un organismo, órgano o célula por administración *in vivo*. El suministro por infección vírica es un método preferente de suministro; no obstante, cualquier método apropiado de suministro del constructo expresión de ARNi de promotor múltiple puede ser utilizado. Los vectores que comprenden los cassettes de promotor múltiple pueden ser administrados a un mamífero huésped utilizando cualquier protocolo conveniente, siendo conocida una serie de protocolos distintos de este tipo en la técnica.

Los ácidos nucleicos pueden ser introducidos en los tejidos o células huésped por cualquiera de una serie de rutas, incluyendo infección vírica, microinyección, o fusión de vesículas. También, se puede utilizar la inyección para administración intramuscular, tal como se ha descrito por Furth y otros, Anal. Biochem. 115 (205): 365-368 (1992). Los ácidos nucleicos pueden ser recubiertos sobre micropartículas de oro y suministrados de forma intradérmica por un dispositivo de bombardeo de partículas o "pistola de genes" ("gene gun"), tal como se describe en la literatura (ver, por ejemplo, Tang y otros, Nature. 356: 152-154 (1992)), en el que microproyectiles de oro son recubiertos con ADN, y luego bombardeados a células de la piel.

Otro método de suministro útil para el método de la presente invención comprende la utilización de tecnología Cycloset™, tal como se describe en la patente U.S.A Nº 6.509. 323 de Davis y otros. La plataforma de tecnología Cycloset se basa en moléculas de glucosa en forma de taza, que se repiten de forma cíclica, conocidas como ciclodextrinas. La "taza" de la molécula de ciclodextrina puede formar "complejos de inclusión" con otras moléculas, haciendo posible combinar los polímeros Cycloset con otras fracciones para incrementar la estabilidad o añadir ligandos de direccionado. Además, las ciclodextrinas se ha observado que son seguras en humanos (ciclodextrinas individuales incrementan habitualmente la solubilidad en medicamentos aprobados por la FDA orales y de tipo IV), y se pueden adquirir en calidad farmacéutica a gran escala y coste reducido. Estos polímeros son extremadamente solubles en agua, no tóxicos y no inmunogénicos a dosis terapéuticas, incluso cuando se administran repetidamente. Los polímeros pueden ser adaptados fácilmente para soportar una amplia gamma de agentes terapéuticos de moléculas pequeñas a cargas medicamentosas que pueden ser significativamente más altas que los liposomas.

Los vectores que comprenden los cassettes de promotor múltiple, pueden ser formulados en preparaciones para inyección o administración por disolución, suspensión o emulsión de los mismos en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites, glicéridos sintéticos de ácido alifático, esteres de ácidos alifáticos de cadena larga o propileno glicol, y, en caso deseado, con aditivos convencionales, tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizantes y conservantes.

Además, los vectores que comprenden los cassettes de promotor múltiple pueden ser formulados en composiciones farmacéuticas por combinación con portadores apropiados farmacéuticamente aceptables o diluyentes. En formas de dosificación farmacéutica, los vectores que comprenden los cassettes de promotor múltiple pueden ser administrados solos o en asociación o combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los técnicos en la materia apreciarán fácilmente que los niveles de dosis para vectores que comprenden los cassettes de promotor múltiple variarán como función de la naturaleza del vehículo de suministro, la facilidad relativa de transducción de las células diana, el nivel expresión de las especies de ARNi en las células diana, y similares.

55 EJEMPLOS

Los constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple, según la presente invención, pueden ser utilizados para el tratamiento de una infección por virus de hepatitis C (HCV). Basándose en estadísticas recogidas desde los Centros para Control y Prevención de Enfermedades, casi el 2% de la población de Estados Unidos, casi 4 millones de personas, está infectada por HCV. Inicialmente, la mayoría de individuos afectados con HCV no muestran síntomas; no obstante, más del 80% desarrollarán enfermedades de hígado crónicas y progresivas, llevado eventualmente a cirrosis o a carcinoma hepatocelular. El HCV es el indicador principal para trasplante de hígado en los Estados Unidos y tiene como resultado la muerte de 8.000 a 10.000 americanos cada año. A nivel global, la Organización Mundial de la Salud estima que hay más de 170 millones de individuos afectados con tasas de infección que llegan a 10-30% de la población general en algunos países.

El HCV es un virus de ARN con envoltente, de cadena única, de sentido positivo, que pertenece a la familia de los Flaviviridae. El ciclo infeccioso de HCV empieza de manera típica con la entrada de la partícula vírica en la célula, por unión, mediada por receptor e internalización. Después de descubrimiento del citoplasma, la cadena positiva de ARN que comprende el genoma puede interactuar directamente con la maquinaria de traducción de la célula huésped. Al carecer metilación en 5' cap, el ARN forma una estructura secundaria extensa en la Región No Traducida 5' (UTR) que sirve como lugar de entrada ribosomal interno (IRES) y permite la unión directa de la subunidad 40S en la etapa de inicio del proceso de traducción.

El genoma de HCV, que tiene una longitud aproximada de 9600 nucleótidos, codifica un solo marco de lectura abierto, largo, llamado la poliproteína (mostrado en la figura 8A). Las proteínas víricas son producidas como precursores enlazados a partir de la poliproteína, que es fraccionada subsiguientemente en productos maduros por una amplia variedad de enzimas víricas y celulares. Codificadas entre los genes, se encuentran proteínas estructurales, incluyendo las glicoproteínas de núcleo y de envoltente, llamadas de este modo porque son componentes estructurales integrales en viriones de progenie. Las proteínas no estructurales que proporcionan funciones indispensables, tales como la ARN polimerasa dependiente de ARN se producen igualmente. La maquinaria de replicación vírica es establecida dentro del citoplasma de las células infectadas que transcriben el ARN de sentido positivo en un intermedio de cadena negativa. De este modo, el ARN genómico de HCV sirve, tanto como plantilla para su propia replicación y como ARN mensajero para traducción de las proteínas codificadas víricamente. La cadena negativa es transcrita nuevamente en una cadena positiva de ARN, amplificando de esta manera el número de copias de cadena positiva en la célula. En esta etapa, la cadena positiva puede interactuar con la maquinaria de traducción de la célula huésped nuevamente, o si se han acumulado suficientes proteínas estructurales, puede ser empaquetada en viriones. Después de la salida de la célula, el virus repite el ciclo infeccioso.

Ejemplo 1: Desarrollo de un vector de expresión AAV-2 para suministro *in vivo* de secuencias ARNsh

Antes de comprobar el suministro de ARNsh por partículas infecciosas, se construye y valida el plásmido de expresión apropiado. Hay, por lo menos, dos características que pueden ser consideradas cuando se diseña el constructo de expresión de de ARNi de promotor múltiple: 1) el constructo debe ser empaquetado eficazmente en un virion de progenie; y 2) el plásmido debe proporcionar elevados niveles de expresión de ARNsh. Además, a efectos de comprobar los diferentes constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple, debe existir un medio de evaluar la eficiencia de la transfección y transducción.

Los vectores AAV-2, a los que se han extraído ("gutted") "rep" y "cap" proporcionan al núcleo (se designará a continuación como vector rAAV) para el constructo de expresión de de ARNi vírico. Este vector ha sido utilizado extensamente en estudios de AAV y las exigencias para empaquetado eficaz son bien comprendidas. Los promotores U6 y H1 se utilizan para la expresión de secuencias de ARNsh, si bien ha habido informes de niveles muy distintos de inhibición de un ARNsh idéntico activado independientemente por cada promotor. No obstante, la construcción del vector es tal que se pueden cambiar fácilmente promotores si se observa dicha variación.

Igual que, virtualmente, cualquier sistema de suministro vírico, el vector rAAV debe cumplir ciertos criterios de dimensiones a efectos de ser empaquetado eficientemente. En general, un vector rAAV debe tener una longitud de 4300-4900 nucleótidos ((McCarty, y otros. Gene Ther. 8: 1248-1254 (2001)). Cuando el vector rAAV se encuentra dentro de estos límites, se debe añadir un fragmento "stuffer" (Muzyczka, y otros, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158: 970129 (1992)). Alternativamente, el constructo de expresión de de ARNi de promotor múltiple de rAAV puede ser complementado con dos o más cassettes de expresión de ARNi de promotor múltiple.

En la realización del vector rAAV que se ha descrito, cada componente promotor/ARNi/finalizador tiene una longitud aproximada de 400 nucleótidos, dejando mucho sitio para la inclusión de muchos componentes promotor/ARNi/finalizador por cada cassette de expresión. Alternativamente, uno o varios cassettes marcadores seleccionables pueden ser transformados en un constructo de expresión de ARNi de promotor múltiple de rAAV a efectos de evaluar la eficacia de transfección del constructo de expresión de rAAV, y también permitir la cuantificación de la eficiencia de transducción de células diana por el constructo de expresión de rAAV, suministrado con intermedio de partículas infecciosas.

El constructo de expresión de prueba inicial, activa la expresión de una especie de ARNsh, diseñada a partir de secuencias con capacidad demostrada en inhibir la actividad de luciferasa de un constructo indicador (ver, Elbashir, y otros, Embo. J. 20 (23): 6877-6888 (2001)). Los elementos del cassette de ARNi, incluyendo el promotor, ARNsh y la secuencia finalizadora son cortas y se ensamblan independientemente de nuevo, utilizando oligonucleótidos complementarios largos que, a continuación, son clonados en un vector vírico utilizando múltiples lugares de clonado. Un plásmido de expresión disponible comercialmente, que codifica la producción de luciferasa, funciona como el indicador a efectos de verificar la capacidad del ARNsh para regular de forma descendente las secuencias diana (tal como se muestra en la figura 5).

Si bien el ARNsh contra luciferasa ha sido validado previamente, la eficacia de ARNsh suministrado por rAAV, es evaluada *in vitro* antes de probar el constructo *in vivo*. Los constructos de prueba e indicador son transfectados en células permisivas utilizando técnicas estándar. Un constructo de expresión de rAAV en el que el ARNsh específico de luciferasa ha sido sustituido por una secuencia de ARNsh no relacionada, se utiliza como control negativo en los experimentos. El porcentaje relativo de eficiencia de transfección, se estima directamente evaluando los niveles del marcador selectivo utilizando microscopio de fluorescencia. Para evaluar la actividad inhibitoria del ARNsh se mide la actividad de luciferasa utilizando kits comerciales estándar. De manera alternativa, el análisis cuantitativo de PCR en tiempo real (Q-PCR) es realizado en un ARN que es cosechado y purificado a partir de placas experimentales paralelas. Las disminuciones de actividad superiores a 90%, con respecto a la actividad recuperada en lisados procedentes de células tratadas con las especies de ARNsh no relacionadas, son una indicación de que el ARNsh es altamente funcional.

Se llevan a cabo experimentos subsiguientes a efectos de evaluar los efectos de ARNsh sobre un sistema indicador de luciferasa, que es transfectado en hígados de ratón, de manera similar al trabajo de McCaffrey y otros, en Nature. 418: 38-39 (2002). Los ácidos nucleicos suministrados a ratones por métodos de transfección hidrodinámicos (inyección a alta presión en la vena de la cola) básicamente se localizan en el hígado. De manera similar al principio que controla la cotransfección en cultivo celular, la inyección simultánea de múltiples plásmidos forma una mezcla que permite frecuentemente la penetración de todos los constructos de expresión de la misma célula. De este modo, aunque los procedimientos de inyección en la vena de la cola están bien documentados para transfectar solamente 5-40% de los hepatocitos del hígado (McCaffrey, y otros, Nature Biotech. 21 (6): 639-644 (2003)), la coinyección permite el suministro del sistema indicador y el constructo de expresión en las mismas células.

El constructo de expresión de rAAV que lleva la secuencia de ARNsh dirigida contra la luciferasa, es coinyectado con el constructo indicador que codifica el gen de luciferasa. En animales que reciban un control negativo, es coinyectado un constructo de expresión que lleva un ARNsh no relacionado con el constructo indicador. Después siete días, los ratones son sacrificados y se recogen los hígados. Se mide la actividad de luciferasa en los lisados generados a partir de una parte del hígado. Las partes restantes del hígado son utilizadas para mediciones Q-PCR y también para análisis histológico para determinar expresión de proteína marcadora para normalización de los datos. Los métodos alternativos para evaluar la eficacia de la transfección pueden incluir mediciones ELISA de suero a partir de ratones que han sido coinyectados con un tercer plásmido marcador para una proteína segregada, tal como α 1-antitripsina humana (hAAT) ((Yant, y otros, Nature Genetics.25: 35-41 (2000), ver también McCaffrey, y otros, Nature Biotech. 21 (6): 639-644 (2003)).

Una vez se ha establecido que el constructo de expresión es funcional, tanto en sistemas de cultivo de células *in vitro* como también en modelos de ratones *in vivo* utilizando cotransfección de los plásmidos de ADN desnudos, se inician pruebas en el constructo de expresión de rAAV empaquetado en partículas infecciosas. Las partículas infecciosas son producidas a partir de un sistema de AAV libre de helper, disponible comercialmente, que requiere la cotransfección de tres constructos de expresión separados, conteniendo 1) el constructo rAAV que expresa el ARNsh contra luciferasa (flanqueado por los ITR del AAV); 2) el constructo que codifica los genes AAV "rep" y "cap"; y 3) un constructo de expresión que comprende los genes adenovirus helper, requeridos para la producción de virus de titulación elevada. Siguiendo procesos de purificación estándar, las partículas víricas están preparadas para utilización en experimentos.

Antes de que se pueda infundir a ratones con las partículas de rAAV, se establece un sistema indicador en los hígados de los ratones. Se utiliza transfección hidrodinámica para suministrar el constructo indicador de luciferasa y también como plásmido de expresión para hAAT, para controlar diferencias en las eficiencias de transfección de un animal a otro. Los ratones pueden recuperarse durante varios días para establecer niveles suficientes de actividad indicadora.

Después de que se ha establecido en los hígados actividad indicadora de luciferasa, las partículas de rAAV son infundidas en ratones normales C57B1/6 a través de inyección en la vena porta o en la vena de la cola. Las partículas de rAAV que llevan el constructo de expresión de un ARNsh no relacionado, son utilizadas como control negativo. Inicialmente, los ratones son infundidos con dosis relativamente elevadas (2×10^{12} genomas de vector (vg)) que se reducen en experimentos de seguimiento, llevados a cabo para generar curvas de respuesta a la dosis. Después de un tiempo de siete a diez días, los ratones son sacrificados, se recogen los hígados, y se recogen muestras de suero. Los niveles relativos de actividad de luciferasa hepática y ARN son determinados a partir de los hígados aislados utilizando el ensayo de luciferasa y procedimientos Q-PCR anteriormente descritos. Además, se evalúa la eficacia de transducción por medición de la proteína marcadora en cortes en serie de los tejidos hepáticos.

Los resultados del experimento pueden tener un amplio alcance. Se ha estimado que los procesos de transfección hidrodinámica pueden resultar en la transfección de 5-40% de hepatocitos. La transducción de células de hígado por procedimiento de suministro de AAV-2 se ha demostrado que resultan en eficiencias de transducción de 5-10%. Si bien el AAV puede transducir preferentemente la misma masa de hepatocitos que fueron transfectados por el proceso de inyección inicial de la vena de la cola, es posible que los subconjuntos de células que afecta a cada una de las técnicas no se solapen. Si ocurre lo primero, se aprecia una reducción en la actividad de luciferasa relativa a

ratones transducidos con una especie de ARNsh no relacionada. Si ocurre lo último, no se aprecia disminución en la actividad de luciferasa.

5 Se debe verificar que las partículas de AAV suministradas por el constructo de expresión triple inhiben *in vitro* el indicador de fusión de luciferasa-HCV. Se transfectan células de cultivos de tejidos permisivos con uno de los constructos indicadores detallados en la figura 9. Además, cada una de las mezclas de cotransfección es suplementada con un plásmido que codifica para hAAT. Después de 48 horas de incubación, las células son dosificadas con partículas infecciosas que contienen el plásmido de expresión de ARNsh promotor triple contra HCV. Las partículas de AAV que contienen un constructo promotor triple, expresando tres especies de ARNsh no relacionadas, sirven como control negativo. La medición de actividad de luciferasa es utilizada para verificar que el ARNsh suministrado mediante AAV es altamente funcional.

Ejemplo 2: Modificaciones para incrementar la eficiencia de transducción AAV de tejidos de hígado

15 Si bien se ha demostrado que vectores basados en AAV pueden suministrar secuencias deseadas a hepatocitos, el nivel relativo de transducción que tiene lugar con estos tejidos, ha sido tradicionalmente más bien reducido. Para estudios actuales clínicos de hemofilia, que utilizan AAV-2 para suministrar y expresar el factor IX de la sangre, este no es un tejido significativo. Para tratamiento de hemofilia, es crítico solamente restablecer niveles de proteína segregada a niveles terapéuticos. Este restablecimiento puede tener lugar a partir de un pequeño número de células transducidas capaces de expresar niveles significativos de la proteína deseada. No obstante, dado que el mecanismo de acción de ARNi es intracelular y el efecto no se transmite directamente de célula a célula, la eficiencia de la transducción se debe incrementar a efectos de que AAV que expresa ARNsh se utilice como terapéutico.

25 McCarty y otros, fueron capaces de generar un vector AAV complementario (scAAV) que tiene, simultáneamente, una cadena más y una cadena menos del mismo cassette de expresión dentro de su cápsido (Gene Ther. 8: 1248-1254 (2001)). Esto se consiguió mutando el 5' ITR y dejando el 3'ITR intacto. Al mutar o deleccionar el lugar de resolución terminal, otras secuencias AAV no esenciales, eliminando de esta manera posible recombinación por AAV de tipo natural y este constructo, se crea una plantilla de ADN, en la que la replicación empieza en el 3' ITR. Una vez que la mecánica de la replicación alcanza el 5' ITR, no tiene lugar resolución, y la replicación continúa al 3' ITR. El producto resultante tiene, simultáneamente, una cadena plus y menos complementaria, pero está empaquetado eficientemente. Utilizando los vectores scAAV, se incrementó la transducción de células del hígado en 30% de los hepatocitos totales (Fu, y otros, Molec Therapy. 8 (6): 911-7. (2003)). Cuando se suministra intercisternalmente, más del 50% de las células Purkinje del cerebelo fueron transducidas por las partículas scAAV. 30 Thomas y otros, demostraron que los vectores autocomplementarios podían producir niveles de expresión de transgén de luciferasa 50 veces superiores en hígados de ratones que sus correspondientes AAV de cadena única cuando se infundían en hígados de ratones con dosis equivalentes (Thomas, y otros, J. Virol. (en publicación)). Si bien disminuía ligeramente, la diferencia relativa de expresión entre los vectores persistía en 20 veces casi un año después de la inyección.

40 Se utilizan estrategias similares en esta invención. A causa de las limitaciones dimensionales asociadas con el empaquetado del constructo de expresión de ARNi de promotor múltiple rAAV la cantidad de espacio que se puede utilizar para el suministro de secuencias terapéuticas, que ya es muy pequeño en comparación con otros sistemas de suministro vírico, se reduce a la mitad por la utilización de scAAV. Por lo tanto, en vez de ser capaz de empaquetar 4500 nucleótidos, el límite baja a 2250 nucleótidos. Con independencia de ello, las dimensiones del cassette de expresión de ARNi de promotor múltiple permite esta construcción. En la figura 6 se muestra un gráfico de los elementos principales dentro del scAAV.

50 Otras modificaciones de los sistemas de suministro AAV se han utilizado también para aumentar notablemente la eficacia de la transducción, incluyendo la producción de partículas víricas seudotipadas por empaquetado de genomas de vector rAAV-2 con la proteína Cap, procedente de otros serotipos. Dado que se han encontrado entre los serotipos mejor caracterizados de todos, las proteínas Cap de AAV-1 hasta AAV-6 se utilizan de manera muy habitual para seudotipar los vectores AAV-2. Incluso, con las ventajas conseguidas por esta utilización de estrategias de seudotipado, el umbral de eficacia de transducción de hepatocitos se puede incrementar solamente a 15% de la población total. No obstante, se han aislado docenas de otros serotipos de AAV y se han identificado, pero no se han caracterizado en ningún grado apreciable. Por ejemplo, uno de éstos es AAV-8, que se aisló originalmente de tejidos de corazón de mono rhesus. En un esfuerzo para determinar efectos de nuevas proteínas Cap sobre la transducción, se creó un virus seudotipado, en el que el genoma de AAV-2 de cadena única fue seudotipado con AAV cap. Los vectores condujeron el gen LacZ a evaluar la eficacia relativa de transducción de hígados de ratón, después de infusión con dosis crecientes de partículas infecciosas. Un resumen de estos resultados (Thomas, y otros, J Virol. 78 (6): 3110- 22. (2004)) se indica a continuación en la tabla 1.

Tabla 1: Respuesta a la dosis de AAV 2/2 y AAV 2/8 (% beta-hepatocitos gal positivos)

Vector	Dosis (v.g./ratón)				
	5×10^{10}	3×10^{10}	$1,8 \times 10^{11}$	$3,9 \times 10^{12}$	$7,2 \times 10^{12}$
AAV-2/2 LacZ	$0,6 \pm 0,4\%$	$3,0 \pm 0,5\%$	$8,1 \pm 1,0\%$	$8,9 \pm 1,0\%$	NA
AAV-2/8 LacZ	$8,1 \pm 1,8\%$	$14,9 \pm 3,4\%$	$65,8 \pm 9,1\%$	NA	$97,4 \pm 0,3\%$

Al aumentar la dosis de partículas de control infundidas AAV-2/2, existe un incremento modesto en la transducción de hepatocitos; no obstante, el umbral superior de transducción sigue determinado cerca del límite de 10%. De manera sorprendente, partículas pseudotipadas AAV-2/8 transdujeron 8% de hepatocitos a la dosis más baja de partículas administradas; cuyas dosis eran de 30 a 80 veces menores que sus AAV-2/2 equivalentes. De manera adicional, el incremento en la eficiencia de transducción dependiente de la dosis para AAV-2/8 sobrepasó la eficiencia de transducción para AAV-2/2 en más de 97% para la dosis más elevada. Las eficiencias de transducción dentro de este rango posibilitan el suministro eficaz de ARNi a células dentro de los tejidos.

Modificaciones similares de AAV se diseñan en los constructos de expresión de ARNi rAAV. Después de la incorporación de estas simples modificaciones, se generan stocks de virus para pruebas en el sistema de modelo de ratón. Se comprueban los siguientes stocks de virus experimentales rAAV ARNi: AAV-2/2 de cadena única; AAV-2/8 de cadena única; AAV-2/2 autocomplementario; y AAV-2/8 autocomplementario.

Partículas víricas correspondientes, que contienen vectores rAAV, que expresan secuencias de ARNsh no relacionadas, se producen y utilizan como controles negativos. Las disminuciones grandes en los niveles relativos de actividad de luciferasa se correlacionan con incrementos en la eficiencia de transducción.

Ejemplo 3A: Selección y pruebas de agentes de ARNi contra un plásmido de fusión luciferasa-HCV

La selección de los ARNsh útiles como agentes terapéuticos contra HCV no es una proposición simple. Además del problema de la generación de mutantes de escape, la alta tasa de mutación lleva a un grado bastante grande de divergencia de secuencia dentro de una población de individuos infectados que contienen el virus con genotipos con diferencias que llegan a 31-34% en sus secuencias de nucleótidos. Los subtipos (especies con un genotipo determinado) pueden diferir en 20-23%, basándose en comparaciones de secuencias genómicas de longitud completa. Por lo tanto, regiones del genoma vírico con un elevado grado de conservación se identifican preferentemente y se escogen para asegurar la aplicabilidad terapéutica más amplia. Como ejemplo de la forma en la que las secuencias están alineadas y se seleccionan regiones terapéuticamente relevantes, se recogieron 30 secuencias de longitud completa, correspondientes a virus 1 b del genotipo HCV de bases de datos públicas, y se alinearon utilizando el método Jotun Hein y software de análisis MegAlign (DNSTAR). Se identificaron regiones con un alto grado de conservación, tales como una región en 5' UTR (nucleótidos 75-112).

Para seleccionar secuencias candidato, se llevó a cabo una alineación de todas las secuencias publicadas independientes de longitud completa o casi de longitud completa de HCV; actualmente se dispone además de 200 secuencias de este tipo disponibles, representando todos los genotipos conocidos. Varias regiones candidato para selección y desarrollo de agentes terapéuticos de ARNi, existen actualmente y está bien documentado que las regiones 5' y 3' UTR se encuentran entre las regiones más conservadas en el genoma de HCV. A pesar de la percepción de que estas secuencias no codificantes pueden no representar secuencias óptimas para su designación como diana, debido al potencial de impedimento estérico con proteínas de complejos de traducción celular o proteínas reguladoras, Yokota y otros han identificado ya un ARNi altamente funcional dirigido al 5' UTR de un sistema replicón (EMBO Rep. 4 (6): 602-608 (2003)). Si bien sería ventajoso identificar varias regiones de identidad absoluta dentro de tramos individuales de 21 nucleótidos (dimensión correspondiente de las secuencias diana en una especie ARNsh) los análisis realizados hasta el momento demuestran que este grado de conservación no tiene lugar dentro de los diferentes subtipos de un genotipo especificado, mucho menos en todos los genotipos. Por lo tanto, la selección puede comprender segmentos del genoma, en las que más del 80% de las regiones mantienen conservación absoluta. En una construcción final de candidato preclínico, la expresión de tres ARNsh independientes compensa la variabilidad de la secuencia, permitiendo una terapia de combinación contenida dentro de un único vehículo de suministro.

De manera alternativa, si zonas conservadas que cumplen con el criterio de selección en un análisis de todos los genotipos HCV no se identifican, los análisis de secuencia se pueden restringir al genotipo 1 (1a y 1b), lo que representa casi las tres cuartas partes de la población infectada en Estados Unidos y, a excepción de África, es el genotipo predominante en todo el mundo. Además, la terapia actual más eficaz anti-HCV, una combinación de interferón pegilado con Ribavirin (un análogo de guanósina) es bastante ineficaz contra el genotipo 1, pero muy eficaz contra los otros genotipos. Por lo tanto, existe una gran necesidad de una terapia alternativa en la población de pacientes más grande. Como alineaciones de secuencia, solamente revelan homología, otros criterios de selección, tales como contenido relativo de GC y falta de especificidad cruzada cuando son interrogados con respecto a bases de datos de secuencias, se aplican cuando se seleccionan los agentes ARNi finales a comprobar.

Por ejemplo, para un experimento, se llevó a cabo alineación para múltiples secuencias a partir de subtipos HCV 1a y 1b. Algunas regiones conservadas fueron identificadas como suficientemente largas para seleccionar agentes ARNi para comprobar (>19 nucleótidos). Las regiones 5' UTR y 3'UTR fueron las regiones mejor conservadas. Dado que las regiones de homología que fueron identificadas eran muy largas, también se llevó a cabo alineación entre diferentes genotipos. Combinando las dos alineaciones, permitió la selección de regiones conservadas universalmente. Algunas regiones, tales como un largo tramo de las A' o U', o G' y C' se sacaron de consideración porque no se pueden conducir a objetivo con agentes ARNi, dejando regiones "calificadas" para selección adicional. Solamente la región conservada universalmente fue identificada en la totalidad de región de codificación (el marco de lectura abierto) para la totalidad de genotipos de HCV considerados; por lo tanto, las secuencias seleccionadas para dianas, en la mayor parte de los casos, fueron las conservadas en los subtipos 1a y 1b.

Una vez identificadas las regiones "calificadas" se seleccionaron secuencias individuales ARNi aplicando el criterio de que el extremo 5' de la cadena antisentido en el agente ARNi debía poseer una mejor energía libre que el extremo 3'. Se aplicaron las normas de "energía libre" del par adyacente ("Neighbor pair free energy") para calcular la energía libre para los cinco nucleótidos del terminal en los extremos 5' y 3' de todos los agentes ARNi potenciales seleccionados hasta el momento. Como resultado, se identificó un total de 30 agentes ARNi potenciales: diez en el 5'UTR (5'-n), doce en el Marco de Lectura Abierto ORF (C-n), y ocho en el 3'UTR (3'-n) (ver tabla 2). Las localizaciones relativas de estos lugares diana ARNi en el genoma HCV se muestran en la figura 8A.

Tabla 2: Secuencias de ARNi

Agente ARNi	Secuencia ARNi ‡	Secuencia ID N°	Plásmido indicador Luc-HCV	Localización HCV
5'-1	gCTGTGAGGAACACTGTCT	SEQ ID NO. 1	20	IRES 43-62
5'-2	GTCTAGCCATGGCGTTAGT	SEQ ID NO. 2	---	IRES 77-95
5'-3	GGAGAGCCATAGTGGTCTG	SEQ ID NO. 3	16,20	IRES 131-149
5'-4	GCGGAACCGGTGAGTACAC	SEQ ID NO. 4	16	IRES 150-168
5'-5	GTCTGCGGAACCGGTGAGTA	SEQ ID NO. 5	16	IRES 146-165
5'-6	GCGAAAGGCCTTGTGGTACT	SEQ ID NO. 6	16, 17	IRES 270-289
5'-7	GATAGGGTGCTTGCAGTG	SEQ ID NO. 7	16	IRES 295-313
5'-8	GAGGTCTCGTAGACCGTGCA	SEQ ID NO. 8	16, 17	IRES 319-338
5'-9	gCTTGTGGTACTGCCTGATA	SEQ ID NO. 9	---	IRES 279-298
5'-10	gCTGCCTGATAGGGTGCTTG	SEQ ID NO. 10	17	IRES 289-307
C-1	AGATCGTTGGTGGAGTTTA	SEQ ID NO. 11 -	---	Core 427-445
C-2	gTTGGGTAAGGTCATCGATA	SEQ ID NO. 12	---	Core 696-714
C-3	GCCGACCTCATGGGTACAT	SEQ ID NO. 13	18	Core 732-752
C-4	GGTTGCTCTTTCTCTATCT	SEQ ID NO. 14	---	Core 852-870

C-5	GGGATATGATGATGAACTG	SEQ ID NO. 15	---	NS1 1300-1318
C-6	GGATGAACCGGCTAATAGC	SEQ ID NO. 16	---	NS4B 6085-6113
C-7	GGAGATGGGCGGCAACATC	SEQ ID NO. 17	---	NS5A 7046-7064
C-8	GTCTTCACGGAGGCTATGA	SEQ ID NO. 18	---	NS5B 8610-8629
C-9	GTCAACTCCTGGCTAGGCAA	SEQ ID NO. 19	---	NS5B 8811-8830
C-10	gTCCACAGTTACTCTCCAGG	SEQ ID NO. 20	-	NS5B 9019-9037
C-11	gCCTCTTCAACTGGGCAGTA	SEQ ID NO. 21	-	NS5B 9170-9188
C-12	AGCTTAAACTCACTCCAAT	SEQ ID NO. 22	-	NS5B 9196-9214
3'-1	GCTCCATCTTAGCCCTAGT	SEQ ID NO. 23	19	5-23*
3'-2	gTCCATCTTAGCCCTAGTCA	SEQ ID NO. 24	19	7-25*
3'-3	GTCACGGCTAGCTGTGAAA	SEQ ID NO. 25	19	22-40*
3'-4	ACGGCTAGCTGTGAAAGGT	SEQ ID NO. 26	19	25-43*
3'-5	GCTGTGAAAGGTCCGTGAG	SEQ ID NO. 27	19	32-50*
3'-6	GGTCCGTGAGCCGCATGAC	SEQ ID NO. 28	-	41-59*^
3'-7	GCCGCATGACTGCAGAGAGT	SEQ ID NO. 29	-	50-69*^
3'-8	ACTGGCCTCTCTGCAGATCA	SEQ ID NO. 30	-	76-95*^

‡las letras minúsculas indican secuencias no correspondientes al replicón de fusión HCV ni al genoma

Tabla 3: Plásmidos de fusión Luciferasa-HCV

Plásmido de fusión luciferasa-HCV	Región diana HCV
#20	5'1-hasta -5'5
#16	5'3-hasta -5'10
#17	5'6-hasta -5'10
#12	5'7-hasta -5'10, codificación -1
#18	codificación -3
#19	3'1-hasta -3'8
C2&4	codificación -2, codificación -4
C5	codificación -5
C6	codificación -6
C7	codificación -7
C8	codificación -8
C9	codificación -9
C10	codificación -10
C11&12	codificación -11, codificación -12
C6-C9-C12-3'1	codificación -6, codificación -9, codificación -12, 3'1

Para probar la eficacia de las secuencias de ARNi seleccionadas, se suministraron agentes ARNi directamente a células cultivadas junto con un plásmido de fusión de luciferasa-HCV. Una representación esquemática del plásmido de fusión luciferasa-HCV utilizado en estos experimentos se muestra en el panel de la izquierda de la figura 9. Comprende una secuencia de gen que codifica la proteína de luciferasa, luciérnaga ("firefly") fusionada a tramos de 100 bp de ácido nucleico, correspondientes a secuencias diana HCV, es decir, las regiones de HCV de las que se derivaron los agentes ARNi. Los agentes ARNi dirigidos contra una secuencia dentro de la región de 100 bp, si son efectivos, degradarán el producto de transcripción luciferasa-HCV disminuyendo o eliminando la expresión de luciferasa. La tabla 3 indica algunos de los plásmidos correspondientes luciferasa-HCV y las regiones de HCV usadas como diana.

Se obtuvieron agentes ARNi presintetizados de la firma Dharmacon, Inc. (Lafayette, CO). Se sembraron células Huh7 en placas de 12 pocillos a $9,5 \times 10^5$ células por pocillo 24 horas antes del momento de la transfección. En el momento de la transfección las células tenían una confluencia 30-40%. Se mezclaron 350 μ l de OptiMEM (Invitrogen, Inc.) con 15 μ l de NovaFACTOR (VennNova, Pompano Beach, FL), y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se mezclaron 50 μ l de OptiMEM con 0,05 μ g de pRL-SV40 (Promega), 0,45 μ g del plásmido indicador Luc-HCV, y 2 μ l del agente ARNi apropiado (20 μ M stock). En solución NovaFACTOR se añadieron a la mezcla ADN-ARNi y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas una vez con OptiMEM y transfectadas con 400 μ l de la mezcla NovaFACTOR/ADN/ARNi. Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 1,5 horas. Se añadió un mililitro de medio completo a cada pocillo, y se continuó la incubación durante otras 2,5 horas, en cuyo momento el medio fue sustituido por un medio completo reciente. Se continuó la incubación durante dos días.

Después de dos días, el medio fue aspirado y las células fueron sometidas a lisis y medidas en cuanto a expresión de luciferasa de acuerdo con el protocolo doble de luciferasa del fabricante (Promega, Madison, WI). El porcentaje de inhibición fue calculado basándose en unidades de luz relativas de luciferasa normalizadas (RLU) con respecto a células transfectadas con una especie de ARNi no específica sin diana endógena conocida. Los datos fueron normalizados en cuanto a diferencias de eficacia de transfección basada en expresión de actividad de renilla luciferasa a partir de un plásmido PRL-SV40 que fue cotransfectado con los plásmidos de fusión luciferasa-HCV.

La figura 12 muestra unos resultados de inhibición de expresión de luciferasa medidos en unidades de luz relativas por diferentes agentes de ARNi, usando como diana cinco diferentes regiones de 100 bp de HCV, y la figura 13 muestra los resultados de inhibición de expresión de luciferasa, en los que se han expresado los datos de la figura 12 como valor porcentual. Con la consideración de estos resultados, se observa que, como mínimo, se consiguió 50% de inhibición con todos los agentes ARNi seleccionados, y más de la mitad de los plásmidos inhibieron expresión de luciferasa en más de 80%.

La figura 14 muestra la reproductibilidad de los resultados de experimentos llevados a cabo comprobando cuatro agentes ARNi diferentes (5'-1, 5'-2,5'-3, y 5'-4) usando como diana varios segmentos de una secuencia de 100 bp en la región 5' de HCV. Se observará que la reproductibilidad era excelente para cada agente comprobado.

La figura 15 muestra el cambio en inhibición porcentual de expresión de luciferasa 14 y 48 horas después de la transfección a cinco agentes ARNi distintos (5'-3, 5'-4,5'-5, 5'-6 y 5'-7) usando como diana varios segmentos de una secuencia de 100 bp en la región 5' de HCV.

La figura 16 muestra el cambio en inhibición porcentual de la expresión de luciferasa 44 y 72 horas después de la transfección para dos agentes de ARNi distintos, buscando como diana varios segmentos de una secuencia de 100 bp en la región 5' de HCV (5'-1 y 5'-3), cinco diferentes agentes ARNi usando como diana varios segmentos de una secuencia de 100 bp en la región 3' de HCV (3'-1, 3'-2,3'-3, 3'-4 y 3'-5), y un agente ARNi usando como diana un segmento de una secuencia de 100 bp en la región de marco de lectura abierta de HCV (C-3). La inhibición se mantiene a 72 horas después de la infección hasta aproximadamente 10% de los niveles de 44 horas.

La figura 18 muestra la inhibición de luciferasa que resulta del tratamiento con una amplia variedad de agentes de ARNi, usando como diana varias regiones del genoma HCV en un plásmido de fusión luciferasa-HCV. La actividad de luciferasa es medida 48 horas después de cotransfección con un agente ARNi en células Huh7. Se puede apreciar de este dato que los agentes ARNi pueden usar como diana, de manera efectiva, todas las regiones del genoma de HCV resultando en una fuerte inhibición de la señal indicadora de luciferasa.

Ejemplo 3B. Selección y Comprobación de Agentes ARNi con respecto a un Sistema de Replicación Luciferasa-HCV

Si bien muchas de las etapas individuales de la replicación de HCV se comprenden, hasta hace poco tiempo, no existía sistema de cultivo de tejidos que propagara el ciclo vital vírico, haciendo difíciles los estudios del virus. No obstante, se ha desarrollado un sistema de replicación *in vitro* (ver por ejemplo patente USA N°s 5,585, 258; 6,472, 180; y 6,127, 116 de Rice y otros. Un replicón es una parte replicante de forma autónoma del ARN genómico de HCV que puede contener un gen marcador para selección y verificación de replicación. Constructos de HCV-ARN son transfectados en líneas celulares que se pueden conducir a soportar una propagación continua. Siguiendo las

etapas del ciclo infeccioso, el ARN es traducido por la mecánica celular, y produce tanto las proteínas víricas apropiadas requeridas para replicación del genoma como también el marcador seleccionable si existe. Se han generado replicones de longitud completa y subgenómicos y han demostrado que son funcionales, si bien solamente las proteínas no estructurales son obligadas. Las características replicantes de forma autónoma del ARN siguen independientes de expresión de los genes estructurales. Incluso, cuando se encuentran presentes en replicones que expresan toda la longitud del genoma de HCV las proteínas de núcleo y envoltentes no empaquetan de manera efectiva el genoma en partículas infecciosas, resultado en la pérdida de un sistema de modelo para estudiar las etapas de empaquetado, salida y nueva entrada del virus. Con independencia de ello, el replicón es capaz de recrear una parte de la biología y mecanismos utilizados por el HCV.

Además de la utilización de luciferasa y otros indicadores de este tipo o de forma alternativa, el nivel de actividad del replicón se puede medir por una serie de otros métodos. La inhibición de la replicación de HCV puede ser evaluada por observación de los niveles relativos de proteínas no estructurales por microscopía de inmunofluorescencia utilizando un panel de anticuerpos monoclonales específicos de HCV, disponibles comercialmente. De manera alternativa o adicional, se puede utilizar Q-PCR para medir un nivel relativo de ARN genómico de HCV de cada estado transfectado.

La capacidad de los agentes ARNi de inhibir la replicación del ARN genómico fue comprobada por medición de la expresión de renilla luciferasa en una línea celular transformada por el replicón de fusión luciferasa-HCV. No se pudieron comprobar cinco ARNi en el sistema de replicón subgenómico debido a ausencia de la secuencia correspondiente, y se incluyeron en las pruebas, meramente como controles no específicos. Se muestran diagramas esquemáticos de los replicones luciferasa-HCV en las figuras 8B y 8C. Las células fueron sembradas en una placa de 96 pocillos; siguiendo incubación durante 24 horas, se añadió interferón alfa 2B (IFN), del que se conoce que inhibe actividad del replicón de HCV (Blight, y otros, Science. 290: 1972-74 (2000)), en pocillos especificados a una concentración de 100 unidades por ml. Después de otras 48 horas adicionales de incubación, el medio fue descartado, y se generó un extracto celular *in situ*, y se midió la actividad de luciferasa correspondió de manera precisa a los niveles de luciferasa-ARNm (no se muestran datos). En la comprobación de agentes ARNi, se transfectaron 293 Σ células conteniendo el replicón luciferasa HCV (mostrado en la figura 8B) con agentes ARNi, usando como diana una serie de regiones en el genoma de HCV. Las células son recogidas después de 48 horas, se generan extractos y se evalúa el nivel relativo de actividad de luciferasa. La figura 19 muestra los resultados de inhibición de luciferasa por agentes de ARNi dirigidos a varias regiones del replicón luciferasa HCV. Los agentes de ARNi dirigidos a las regiones de codificación C-1 a C-5 no tienen dianas en el replicón de luciferasa-HCV y sirven como controles no específicos adicionales. Nuevamente, las dianas en todas las regiones del genoma de HCV pueden actuar como lugares de inhibición efectivos para agentes de ARNi.

Una vez se han seleccionado varios ARNi altamente funcionales y se han comprobado individualmente, son transfectados de forma triple en células que contienen el sistema replicón. Un control consiste en transfectar un número equivalente de especies de ARNi no relacionadas en paralelo. La actividad inhibitoria de las transfecciones triples es comparada a la actividad de un conjunto de placas paralelas que han sido transfectadas solamente con una especie de ARNi.

Se validan tres agentes ARNi, y las secuencias de codificación para cada ARNsh correspondiente se generan desde oligonucleótidos largos, complementarios, autorealineadores, y son clonados en lugares individuales del vector AAV promotor triple. Este constructo es empaquetado en partículas víricas, de acuerdo con los métodos descritos, utilizando el sistema que resulta en mayor eficiencia de transducción de tejidos de hígado. La longitud total de cada componente promotor/ARNi/finalizador del cassette promotor triple es pequeña (-400 nucleótidos); enlazando tres componentes promotor/ARNi/finalizador conjuntamente, tiene como resultado una secuencia que tiene una longitud de 1200-1300 nucleótidos, mucho menos que el límite de dimensión superior de AAV autocomplementarios.

La actividad inhibitoria de estas partículas es comprobada en líneas celulares que contienen el replicón. La generación de un constructo promotor triple que expresa tres especies de ARNsh no relacionadas sirve como control negativo. La eficacia de las secuencias de ARNsh es controlada por las técnicas de análisis antes mencionadas.

Ejemplo 4: Desarrollo de un Constructo de Expresión de Promotor Triple

La construcción de un constructo de expresión de promotor triple comprende tres secuencias independientes de promotor y finalizador que activan la expresión de las especies de ARNsh individuales en niveles comparables de abundancia. La repetición de elementos promotores puede dejar cassettes de expresión integradas susceptibles de eventos de recombinación; de este modo, se han identificado y validado tres promotores y finalizadores distintos. La síntesis de pequeños ARN nucleares y ARN de transferencia está dirigida por ARN polimerasa III (pol III) bajo el control de promotores específicos de pol III. Dada la abundancia relativamente grande de transcriptos dirigidos por estos elementos reguladores, promotores pol III, incluyendo los derivados de genes U6 y H1, han sido utilizadas para activar la expresión de ARNsh (ver, por ejemplo, Domitrovich y Kunkel. Nucl. Acids Res. 31 (9): 2344-52 (2003); Boden, y otros, Nucl. Acids Res. 31 (17): 5033- 38 (2003a); y Kawasaki, y otros, Nucleic Acids Res. 31 (2): 700-7 (2003)).

Inicialmente la evaluación de la intensidad relativa de promotor de las secuencias específicas de pol III es conducida en vectores que contienen dos promotores únicos, individuales (mostrados en la figura 7). Cada constructo promotor activa la expresión de un ARNsh que ha demostrado inhibición funcional de actividad luciferasa (Elbashir, y otros, Nature. 411: 494-498 (2001 a)). Dado que existe riqueza de datos que demuestran la utilización satisfactoria del promotor U6 para la expresión de ARNsh, se utiliza como estándar para la evaluación de la intensidad relativa de otros promotores. La mayor parte de los promotores objeto de comprobación son muy cortos, la mayor parte en una región de longitud de 200-300 nucleótidos. Los oligonucleótidos largos, que se solapan, son utilizados para ensamblar los promotores y finalizadores nuevamente y, a continuación son clonados en múltiples sitios de clonado que flanquean el ARNsh. El promotor es apareado con la señal de finalización, que tiene lugar de manera natural más abajo del gen, del cual se ha tomado el promotor.

La intensidad relativa de cada promotor es evaluada *in vitro* por la disminución de actividad de un indicador de luciferasa cotransfectado, disponible comercialmente, pGL3Control (mostrado en la figura 7) o pRLSV40 (Promega, Madison, WI). Los constructos de prueba e indicador son transfectados en células permisivas utilizando técnicas estándar. Los controles consisten en un constructo promotor de prueba, en el que el ARNsh funcional contra luciferasa es sustituido por una secuencia ARNsh no relacionada. Un tercer constructo que codifica para la proteína segregada humana α 1-antitripsina (hAAT) es cotransfectado en las células a efectos de evaluar variaciones en eficacias de transfección. Para evaluar actividad inhibitoria del ARNsh se mide la actividad de luciferasa utilizando kits comerciales estándar (Promega, Madison, WI). La disminución mediada por ARNsh en expresión de luciferasa normalizada a niveles hAAT, es una medición indirecta de la intensidad del promotor. De manera alternativa o adicional, se llevan a cabo análisis de PCR cuantitativos en tiempo real (Q-PCR) sobre los niveles de ARN sobre ARN recogido y purificado de placas experimentales paralelas.

Una vez identificados los pares promotores y finalizadores apropiados, se diseña el cassette de expresión de ARNi promotor triple final. Se comprueban varios diseños del vector final incluyendo el que tiene los tres promotores en disposición tandem o dispuestos en sentido de las agujas del reloj y en sentido contrario (es decir, transcritos desde la cadena superior y la cadena inferior del ADN del cassette) o cualquier variación del mismo. Se muestran tres configuraciones en las figuras 3A, 3B y 3C.

Las configuraciones mostradas en las figuras 3B y 3C han sido transcritas en células y comprobadas en cuanto a actividad inhibitoria, utilizando ensayos de actividad de luciferasa. Dos o más promotores, que activan especies distintas de ARNi, pueden resultar en un efecto aditivo o sinérgico inhibitorio, por ello, a efectos de evaluar la funcionalidad y la intensidad relativa de cada uno de los promotores dentro del contexto del constructo de expresión del promotor triple, se generaron variantes de los cassettes de expresión, tal como se detalla en la tabla 4. Utilizando estas especies, se midió el efecto inhibitorio de los ARNsh activados desde cada promotor dentro del constructo de expresión triple o ensayos de luciferasa. De manera alternativa, se utiliza Q-PCR para evaluar niveles relativos de transcritos activados por cada promotor. Si bien la naturaleza autocomplementaria del ARN de horquilla impediría, en general, la medición directa por Q-PCR de estos transcritos de ARN, se pueden sustituir en los vectores tres transcritos distintos, no horquilla, de aproximadamente las mismas dimensiones, en lugar del ARNsh utilizando constructos de expresión de ARNi de promotor múltiple vírico con cassettes tales como los mostrados en las figuras 3B y 3C.

Los siguientes promotores de ARN pol III clase 3: U6-1, U6-8, U6-9, longitud H1, Y4 humano, Y5 humano, fueron seleccionados, sintetizados y clonados en un constructo promotor simple o múltiple. El ARNsh específico de luciferasa fue clonado más abajo del constructo de promotor único, o más arriba de uno de los promotores en el constructo promotor triple (tabla 4).

72 horas después de la transfección, los medios fueron aspirados y las células fueron sometidas a lisis y medidas en cuanto a expresión de luciferasa de acuerdo con el protocolo de luciferasa dual del fabricante (Promega, Madison, WI). Se calculó el porcentaje de inhibición basándose en unidades ligeras relativas de luciferasa normalizada (RLU) con respecto a células con falso tratamiento (mock-treated) (control negativo). Un agente ARNi no relacionado fue utilizado como control mock/negativo en cada experimento. La normalización de las RLU de luciferasa para eficacia de transfección fue realizada basándose en la expresión de renilla luciferasa expresada a partir de plásmido pRLSV40 cotransfectado con plásmidos diana.

Se demostró que todos los promotores tenían una actividad similar en ambos constructos tipo de la figura 3C en células Huh7 (17A), y constructos del tipo de la figura 3B en células 293 (17B). Se puede apreciar que las características inhibitorias son similares para ARNsh en contextos promotores simple y múltiple. Los datos han demostrado que la inhibición de los ARNsh es comparable en un contexto de promotor triple y en ambas células Huh7 y 293.

Tabla 4: Insertos promotor/ARNsh en constructos del tipo mostrado en las figuras 3B y 3C utilizados para evaluar contribución inhibitoria relativa de cada cassette de expresión.

Constructo	Promotor/ARNsh		
	A U6-1	B U6-8	C U6-9
Constructo I	ARNsh-LUC	vacío	vacío
Constructo II	vacío	ARNsh-LUC	vacío
Constructo III	vacío	vacío	ARNsh-LUC

- 5 Se utilizaron plásmidos comprendiendo los cassettes promotor/ARNsh/finalizador del tipo mostrado en la figura 3B para evaluar la contribución inhibitoria relativa de los agentes de ARNsh expresados a partir de cassettes de expresión de promotor múltiple. Los plásmidos que comprenden constructos de ARNsh que utilizan como diana diferentes regiones del genoma de HCV son situados de manera operativa bajo el control de diferentes promotores.
- 10 La tabla 5 muestra que ARNsh se encuentran bajo control de los promotores separados incluyendo agentes de ARNsh bajo el control del promotor en la posición B que era inactiva. El plásmido #16 de fusión de luciferasa-HCV conteniendo la secuencia de HCV de las regiones 5'-3 a 5'-10 enlazadas al gen de luciferasa fueron cotransfectados en células Huh7 junto con constructos de promotor múltiple. La figura 20 muestra la inhibición incrementada de luciferasa cuando es cotransfectada con un constructo de expresión de ARNsh de promotor múltiple/doble en comparación con un constructo que comprenda un ARN único enlazado a un promotor único.
- 15

Tabla 5: Insertos Promotor/ARNsh en constructos del tipo mostrado en la figura 3B utilizados para evaluar contribución inhibitoria relativa de un individuo y promotores duales en un cassette de expresión de promotor múltiple.

Constructo	Promotor/ARNsh		
	A U6-9	B inactivo	C U6-8
Constructo I	5'-3	5'-1	vacío
Constructo II	5'-3	C-12	vacío
Constructo III	5'-3	5'-8	vacío
Constructo IV	5'-3	5'-8	5'-6

20

Ejemplo 4B: Prueba de constructos de promotor triple de ARNsh *in vitro*

- 25 Se generaron cassettes de promotor triple del tipo mostrado en la figura 3C con los siguientes promotores: U6-9 en posición A, U6-1 en posición B, y U6-8 en posición C. Los promotores activaron la transcripción de secuencias ARNsh usando como diana varias posiciones del genoma de HCV o fueron seguidos por tramos de T' en la configuración "vacía" para impedir "salto" (read-through). Los constructos de promotor único/ARNsh utilizados como controles fueron construidos utilizando un promotor U6-1. Los constructos de promotor único o triple fueron cotransfectados con plásmidos indicadores de luciferasa-HCV que contenían diferentes regiones diana de HCV. La figura 21 muestra los resultados de inhibición de luciferasa después de cotransfección con constructos de promotor simple o múltiple que utilizan como diana diferentes regiones en el genoma de HCV y uno de tres plásmidos de fusión luciferasa-HCV conteniendo secuencias de regiones diana del genoma de HCV. La actividad de luciferasa fue medida 72 horas después de cotransfección en células Huh7. Se puede observar en el gráfico superior de la figura 21 que ARNsh específico para la región C-12 de HCV muestra la actividad inhibitoria apropiada con respecto al plásmido indicador de luciferasa que contiene la región de codificación C-12 de HCV. No se observó inhibición no específica cuando se expresó ARNsh específicos para otras regiones de HCV, de manera individual o como parte de un cassette promotor indicador de luciferasa-HCV de esta invención. Se pueden apreciar resultados similares en el gráfico medio en el que el plásmido indicador de luciferasa-HCV contiene secuencia de la región de codificación C-9 de HCV. En este caso, ARNsh específico de la región C-9, expresado a partir de un cassette de promotor único o de promotor triple, tenía la actividad inhibitoria más fuerte de los agentes ARNsh comprobados. El gráfico inferior muestra la inhibición de luciferasa, como resultado de la cotransfección con constructos de promotor único o promotor triple y plásmidos indicadores que contienen la región 5'6 de HCV. Se puede observar que la inhibición más fuerte resulta de constructos que contienen ARNsh específicos para la diana 5'6 en cualquiera de los constructos promotores simple o múltiple. Los constructos de promotor triple de esta invención funcionan suprimiendo de manera efectiva dianas de genes específicos.
- 30
- 35
- 40
- 45

Ejemplo 5: Prueba de agentes constructos de promotor triple de ARNsh *in vivo*

La evaluación *in vivo* de constructos de promotor múltiple de esta invención fueron elaboradas por cotransfección de hígado de ratón con el ADN de plásmido de promotor múltiple/ARNsh del tipo mostrado en la figura 3C y el plásmido indicador de fusión apropiado de luciferasa de luciérnaga-HCV utilizando el proceso de inyección hidrodinámica de la vena de la cola. El plásmido de promotor múltiple/ARNsh utilizado en este caso, controló la expresión de la especie de ARNsh que usaba como diana la codificación 9, codificación 12 y la posición 5'8 de HCV. Los ratones de control negativo fueron inyectados con constructo indicador y un ARNsh irrelevante. Además, los ratones fueron inyectados con plásmidos que expresaban la proteína renilla-luciferasa. Esta proteína fue utilizada para normalizar la eficacia de la transfección de hígado de ratón. 48 horas después de la inyección, los animales fueron sacrificados y se recogieron los hígados. Se ensayaron lisados de hígados en cuanto a actividad de luciferasa de luciérnaga y renilla luciferasa utilizando un kit de luciferasa Promega. Se evaluaron los niveles de inhibición inducidos por la expresión de ARNsh de los constructos de horquilla ("hairpin") con respecto al control negativo. Los resultados mostrados en la tabla 6 muestran que los constructos de promotor triple de esta invención inhiben de manera efectiva la señal indicadora *in vivo*.

Tabla 6: inhibición porcentual de señal de luciferasa de luciérnaga por plásmido de promotor triple/ARNsh

Grupo #	n	Plásmido que expresa ARNsh (5 μ g/ratón)	Plásmido indicador (12 μ g/ratón)	Luciferasa de luciérnaga RLU (normalizada a Renilla)	% inhibición por ARNsh triple en comparación con control de ARNsh no específico
21	5	Promotor triple/ARNsh (5'8as, C-9s, C-12as)	C-9 (pBen71)	0.05	98%
23	5	5'-3 único no específico (ARNsh no específico)	C-9 (pBen71)	3.20	n/a
25	5	Promotor triple/ARNsh (5'8as, C-9s, C-12as)	C-11/12 (pBen73)	1.00	93%
27	5	5'-3 único no específico (ARNsh no específico)	C-11/12 (pBen73)	15.10	n/a

Se suministran a ratones normales, partículas de AAV infecciosas conteniendo vectores que expresan el ARNsh dirigido contra secuencias de HCV, por inyección por la vena de la cola o inyección portal hepática. Las partículas de AAV infecciosas que expresan tres ARNsh no relacionados sirven como control negativo. Inicialmente se utiliza una dosis bastante elevada de virus, por ejemplo 2×10^{12} genomas de vector, si bien se llevaron a cabo experimentos subsiguientes para establecer curvas de dosis-respuesta. Se inyectó en varios tiempos un plásmido indicador apropiado de fusión de luciferasa de luciérnaga-HCV utilizando el proceso de inyección hidrodinámica de la vena de la cola. 48-72 horas después de la inyección del plásmido indicador los ratones son sacrificados, los hígados son recogidos, y se reúnen muestras de suero. Se utilizó la actividad de luciferasa de luciérnaga como modelo ("benchmark") para evaluar la eficacia del ARNsh suministrado mediante AAV. Además, el control de los niveles de suero de hAAT o niveles en hígado de renilla luciferasa, se utilizan para determinar la eficacia de la transfección entre animales. Los niveles de suero de las enzimas de hígado alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, y factor de necrosis tumoral alfa se miden para asegurar que no se induce por el tratamiento toxicidad hepática general.

Ejemplo 6: Comprobación de suministro por AAV de ARNsh contra un sistema modelo de HBV replicante *in vivo*.

No hay modelo ideal de animal pequeño para comprobar la eficacia de constructos de expresión de ARNsh suministrados por AAV contra HCV. No obstante, la comprobación del constructo de ARNi de expresión de AAV en un sistema modelo alternativo puede ser utilizada para evaluar la extensión de inhibición de replicación vírica en el hígado. Si bien la composición de secuencias del ARNsh suministrado es necesariamente diferente en este modelo, el resto del sistema, incluyendo el detector de expresión del promotor triple de AAV y componentes de empaquetado permanecen sin cambios. Se utiliza el sistema modelo para el virus de Hepatitis B (HBV). La selección de las secuencias de ARNsh a incluir en el constructo de expresión de AAV de promotor triple para usar HBV como diana, se escogen basándose en la eficacia de las secuencias de ARNsh publicadas hasta el momento (McCaffrey, y otros.

Nature Biotech. 21 (6): 639-644 (2003); Ying, y otros, Biochem. Biophys. Res. Commun. 309 (2): 482-484 (2003); Klein, y otros, Gastroent. 125 (1): 9-18 (2003); y Shlomai, y otros Hepatol. 37 (4): 764-70 (2003)). El constructo apropiado de expresión de AAV con el promotor triple activando tres ARNsh específicos de HBV es empaquetado a continuación en partículas víricas de acuerdo con los métodos que se describen.

5 Los ratones son inyectados, en primer lugar, por procedimientos de transfección hidrodinámica con plásmidos de expresión que llevan las secuencias del genoma de HBV y que se permite establecer replicación de HBV. Para evaluar la eficacia de la transfección, se añade un plásmido que codifica para hAAT en la mezcla para coinyección. Se evalúan las indicaciones iniciales de actividad de HBV por la aparición del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HBsAg) y el antígeno de núcleo de HBV (HBcAg) en el suero de los animales tratados por ensayos ELISA, recogidos por sangrado del plexo retro-orbital.

10 Siguiendo el establecimiento de replicación de HBV en los hígados de ratón, se introducen las partículas víricas de AAV que empaquetan los constructos de promotor triple que codifican los ARNsh de HBV en el ratón utilizando inyección de la vena de la cola o inyección de la vena porta hepática. Se utilizan partículas víricas de AAV que llevan un constructo de expresión de AAV que codifica tres ARNsh no relacionados con HBV como control negativo. En la terminación del experimento, se controlan muestras de suero para regulación de las cantidades de proteínas HBsAg y HBcAg. De manera alternativa o adicional, se evalúan tejidos de hígado en cuanto a niveles relativos de ARN de HBV por Q-PCR. Se evalúa la toxicidad sistémica del hígado por control del suero para alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, y factor alfa de necrosis tumoral por ELISA.

15 La figura 10 es un gráfico ilustrativo de una realización de un cassette de promotor triple precursor que muestra sitios de restricción únicos, útiles para insertar o eliminar especies de ARNi o elementos finalizadores o para cambiar los promotores U6-9, pU6 o U6-8 que se han mostrado. Además, las flechas muestran la dirección de transcripción de cada uno de los tres componentes promotor/ARNi/finalizador. Las figuras 11A y 11B/11C muestran la secuencia de nucleótidos (SEQ ID N° 31 y 32, respectivamente) de dos realizaciones de los cassettes de promotor precursor de esta invención. La figura 10 muestra las localizaciones de los promotores U6-9, pU6 o U6-8, así como los sitios de restricción de un cassette de promotor precursor de esta invención.

LISTADO DE SEQUENCIAS

<110> Benitec, Inc.

Roelvink, Petrus W.

Suhy, David A.

Kolykhalov, Alexander A.

<120> CASSETTES DE EXPRESIÓN DE PROMOTOR MÚLTIPLE PARA SUMINISTRO SIMULTÁNEO DE AGENTES DE ARNi

<130> BENI/0003

<150> US 60/553,920

<151> 2004-03-17

<150> US 60/550,504

<151> 2004-03-05

<160> 32

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 1

gctgtgagga actactgtct 20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 2

gtctagccat ggcgtagt 19

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 3

ggagagccat agtggctg 19

<210> 4

<211> 19

<212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 'Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 4
 gcggaaccgg tgagtacac 19

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 'Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 5
 gtctgcgga ccggtgagta 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 6
 gcgaaaggcc ttgtgtact 20

<210> 7
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 7
 gatagggtgc tgcgagtg 19

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 8
 gaggtctcgt agaccgtgca 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 9
gcttggtgta ctgctgata 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 10
gctgctgat aggtgcttg 20

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 11
agatcgttg tggagtta 19

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 12
gttgggtaag gtcacgata 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 13
gccgacctca tgggtacat 20

<210> 14
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 14
 ggttgctctt tctctatct 19

<210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 15
 gggatatgat gatgaactg 19

<210> 16
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 16
 ggatgaaccg gctaatagc 19

<210> 17
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 17
 ggagatgggc ggcaacatc 19

<210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 18
 gtcttcacgg aggctatga 19

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 19
 gtcaactcct ggctaggcaa 20

<210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 20
 gtccacagtt actctccagg 20

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 21
 gcctcttcaa ctgggcagta 20

<210> 22
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 22
 agcttaaact cactocaat 19

<210> 23
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 23
 gctccatctt agccctagt 19

<210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 24
 gtccatctta gccctagtca 20

<210> 25
 <211> 19
 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 25

gtcacggcta gctgtgaaa 19

<210> 26

<211> 19

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 26

acggctagct gtgaaaggt 19

<210> 27

<211> 19

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 27

gctgtgaaag gtocgtgag 19

<210> 28

<211> 19

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 28

ggtcgtgag ccgcatgac 19

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 29

gccgcatgac tgcagagagt 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia diana para ARNi de virus de Hepatitis C

<400> 30
actggcctct ctgcagatca 20

<210> 31
<211> 1154
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cassette de expresión múltiple para ARNi

<400> 31

ataaacaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtaactataa	60
cggtcctaag gtagcgaaag ctcagatccg cggccgcgta gtacgatgac tagcatgcag	120
ggcgggtgcgg ctcaggctct gccccgcctc cggggctatt tgcatacgac catttccagt	180
aattcccagc agccaccgta gctatatattg gtagaacaac gagcactttc tcaactccag	240
tcaataacta cgtagttgc attacacatt gggctaatat aaatagaggt taaatctcta	300
ggtcatttaa gagaagtcgg cctatgtgta cagacatttg ttcaggggc tttaaatagc	360
tgggtggtgga actcaactag tgtagatttt tttctgcagg catagcagag atctgggcag	420
gaagagggcc tatttcccat gattccttca tatttgcata tacgatacaa ggctgttaga	480
gagataatta gaattaattt gactgtaaac acaaagatat tagtacaaaa tacgtgacgt	540
agaaagtaat aatttcttgg gtagtttgca gttttaaaat tatgttttaa aatggactat	600
catatgctta ccgtaacttg aaagtatttc gatttcttgg ctttatatat cttgtggaaa	660
ggacgaggat ccggttattt ttttcaattg atctagaaaa aaaaaagcta gtggtacogg	720
tctacgcgg ggccctttac ccagggtgcc ccgggcgctc atttgcattg cccaccaaac	780
aggtaaacct gacaggatcat ccggccagg tacgacctgg cggtcagagc accaaacata	840
cgagccttgt gatgagttcc gttgcatgaa attctcccaa aggctccaag atggacagga	900
aagggcgcgg ttcggtcacc gtaagtagaa taggtgaaag actcccgtgc cttataaggc	960
ctgtgggtga cttcttgcta gcgaccttac gtgttcatgg aattctgtac cgtatatagc	1020
atgactgccc ccgccaattc atctatgtcg ggtgoggaga aagaggtaat gaaatggcat	1080
tatgggtatt atgggtctgc attaataaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg	1140
tattgggcgc tctt	1154

<210> 32

<211> 1971

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cassette de expresión múltiple para ARNi

<400> 32

```

ataaacaat aggggttcg cgcacattc cccgaaaagt gccacctgac gtaactataa      60
cggtcctaag gtagegaaag etcagatccg cggccgcgta gtacgatgac tagcatgcag     120
ggcggtgagg ctcaggctct gccccgcctc cggggctatt tgcatacgac catttcagt     180
aattcccagc agccaccgta gctatattg gtagaacaac gagcacttcc tcaactccag     240
tcaataacta cgttagttgc attacacatt gggctaatat aaatagaggt taaatctcta     300
ggtcatttaa gagaagtcgg cctatgtgta cagacatttg ttccaggggc tttaaatagc     360
tggtggtgga actcaactag tgtagatttt tttctgcagg catagcagag atctgttcgg     420
ctttacgtca cgcgagggcg gcagggagga cggaatggcg gggtttgggg tgggtccctc     480
    
```

ctcgggggag ccctgggaaa agaggactgc gtgtgggaag agaagggtgga aatggcgttt	540
tggttgacat gtgccgcctg cgagcgtgct gcggggaggg gccgagggca gattcgggaa	600
tgatggcgcg ggggtggggc gtgggggctt tctcgggaga ggccctccc tggaaagttg	660
gggtgcgatg gtgaggttct cggggcacct ctggaggggc ctcggcacgg aaagcgacca	720
cctgggaggg cgtgtgggga ccaggttttg cctttagttt tgcacacact gtagttcatc	780
ttatggaga tgctcatggc ctcatgaag ccccacggat ctgggcagga agagggccta	840
tttcccatga ttccctcata tttgcatata cgatacaagg ctgttagaga gataattaga	900
attaatttga ctgtaaacac aaagatatta gtacaaaata cgtgacgtag aaagtaataa	960
tttcttgggt agtttgcagt tttaaaatta tgttttaaaa tggactatca tatgcttacc	1020
gtaacttgaa agtatttcga tttcttggct ttatatatct tgtggaaagg acgaggatcc	1080
ggttattttt ttcaattgta cagctctggg agcggtaacc atgcgtattt gacacacgaa	1140
ggaactaggg aaaaggcatt aggtcatttc aagccgaaat tcacatgtgc tagaatccag	1200
attccatgct gaccgatgcc ccaggatata gaaaatgaga atctggctct taccttcaag	1260
aacattctta accgtaatca gcctctggta tcttagctcc accctcactg gtttttctt	1320
gttgttgaa ccggccaagc tgctggcctc cctcctcaac cgttctgatc atgcttgcta	1380
aaatagtcaa aacccggcc agttaaatat gctttagcct gctttattat gattattttt	1440
gttgttttgg caatgacctg gctacctgtt gtttctccca ctaaaacttt ttaagggcag	1500
ggaattgatc tagaaaaaaaa aaagctagtg gtaccggctc tacgcggggc cctttacca	1560
gggtgccccg ggcgctcatt tgcattgccc acccaacagg taaacctgac aggtcctcgc	1620
ggccaggtag gacctggcgg tcagagcacc aaacatacga gccttgatg gatgtccgtt	1680
gcatgaaatt ctcccaaagg ctccaagatg gacaggaaag ggcgcgggtc ggtcaccgta	1740
agtagaatag gtgaaagact cccgtgcctt ataaggcctg tgggtgactt cttgctagcg	1800
accttacgtg ttcattggaat tctgtaccgt atatagcatg actgcgggcg ccaattcatc	1860
tatgtcgggt gcggagaaag aggtaatgaa atggcattat gggattatg ggtctgcatt	1920
aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgctct t	1971

REIVINDICACIONES

- 5 1. Constructo genético que comprende un cassette de expresión de promotores múltiples que comprende, como mínimo, tres componentes promotor/ARNi/finalizador, en el que cada componente promotor/ARNi/finalizador comprende un elemento promotor, un elemento finalizador, y una secuencia que codifica una especie de ARNi enlazado operativamente al elemento promotor y al elemento finalizador, de manera que la especie de ARNi usa como diana una secuencia de ácidos nucleicos transcrita y, como mínimo, una de las especies de ARNi es codificada por SEQ ID N°: 22.
- 10 2. Constructo genético, según la reivindicación 1, en el que la secuencia de ácido nucleico transcrita procede de un genoma del virus (HCB) de Hepatitis C.
- 15 3. Constructo genético, según la reivindicación 1 ó 2, en el que el constructo genético comprende además, elementos necesarios para empaquetar el constructo en partículas de virus infeccioso.
- 20 4. Constructo genético, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia de cada uno de los elementos finalizadores en cada componente promotor/ARNi/finalizador es distinta de las otras.
- 25 5. Constructo genético, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la secuencia de cada uno de los elementos promotores en cada componente promotor/ARNi/finalizador es distinta de las otras.
- 30 6. Constructo genético, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que cada especie de ARNi usa como diana una diferente región del genoma HCV.
- 35 7. Constructo genético, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que, como mínimo, una de las tres o más especies de ARNi es codificada por SEQ ID N°s: 6 ó 19.
- 40 8. Constructo genético, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las, como mínimo, tres especies de ARNi son codificadas por SEQ ID N°s:6, 19 y 22.
- 45 9. Constructo genético, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las tres o más especies de ARNi usan como diana secuencias transcritas de ácido nucleico que tienen diferencias de secuencia entre variantes, y cada una de las especies de ARNi usan como diana uno o varios subconjuntos de variantes.
- 50 10. Constructo genético, según la reivindicación 9, en el que dichas diferencias son polimorfismos de nucleótido único (SNP).
- 55 11. Constructo genético, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó 9 a 10, en el que las especies de ARNi usan como diana secuencias víricas que sufren mutación rápida.
- 60 12. Constructo genético, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó 9 a 11, en el que cada una de las especies de ARNi usa como diana una o varias variantes de una secuencia de ácido nucleico transcrita.
- 65 13. Constructo genético, según la reivindicación 12, en el que dichas variantes incluyen mutantes de escape vírico.
14. Constructo genético, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó 9 a 13, en el que las especies de ARNi se basan en la secuencia de la secuencia de ácidos nucleicos transcrita y se basan adicionalmente en secuencias que tienen mutaciones de puntos que resultan resistentes a tratamiento ARNi.
15. Constructo genético, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que cada una de las especies de ARNi es, como mínimo, idéntica al 90% con la secuencia de ácidos nucleicos transcrita.
16. Constructo genético, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó 9 a 14, en el que las especies ARNi son, como mínimo, 90% idénticas a dicha secuencia de ácidos nucleicos transcrita, y a dos o más mutaciones en dicha secuencia de ácidos nucleicos que se muestran como mutantes de escape.
17. Constructo genético, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que dichas especies de ARNi están expresadas en forma de ARNsh.
18. Constructo genético, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, para utilización en la inhibición de una o varias secuencias de ácidos nucleicos transcritas de virus de Hepatitis C.
19. Constructo genético, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, para utilización en la inhibición de una o varias secuencias de ácidos nucleicos transcritas a partir de virus de Hepatitis C, en el que dicho constructo genético está empaquetado en partículas víricas o no víricas.

20. Utilización del constructo genético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 en la fabricación de un medicamento para utilización, según la reivindicaciones 18 ó 19.

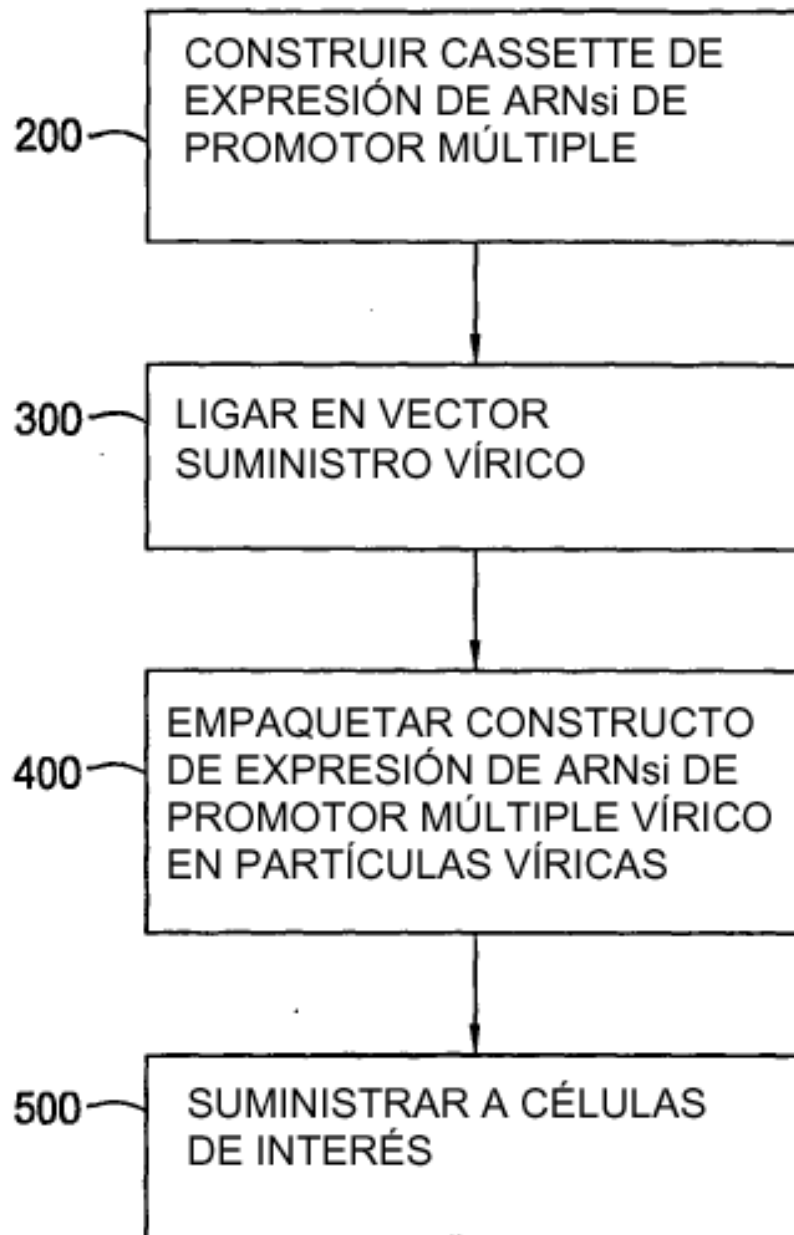


FIG. 1

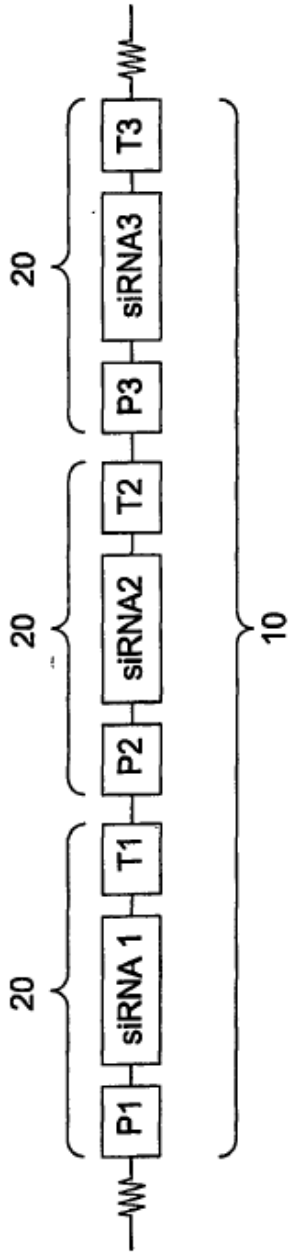


FIG. 2A

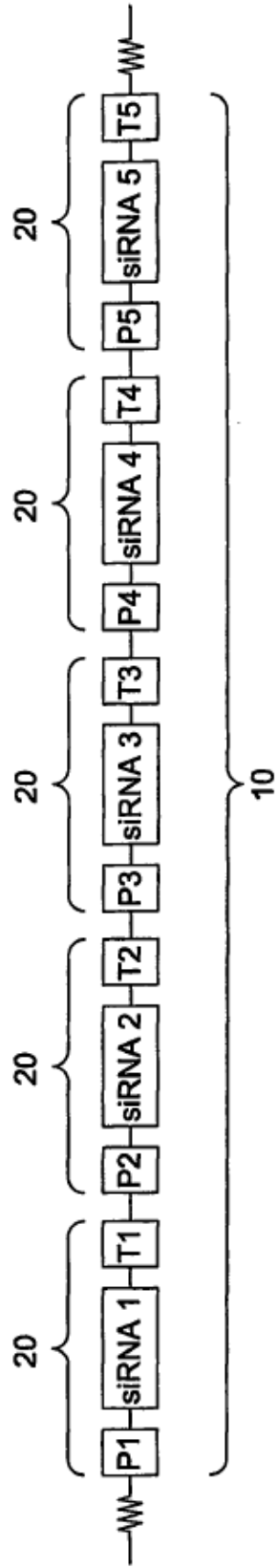


FIG. 2B

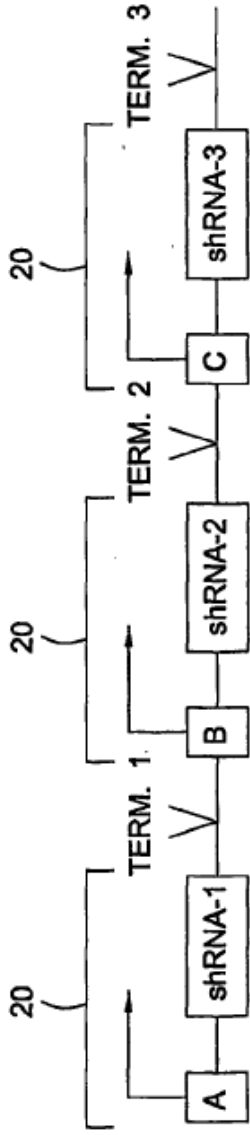


FIG. 3A

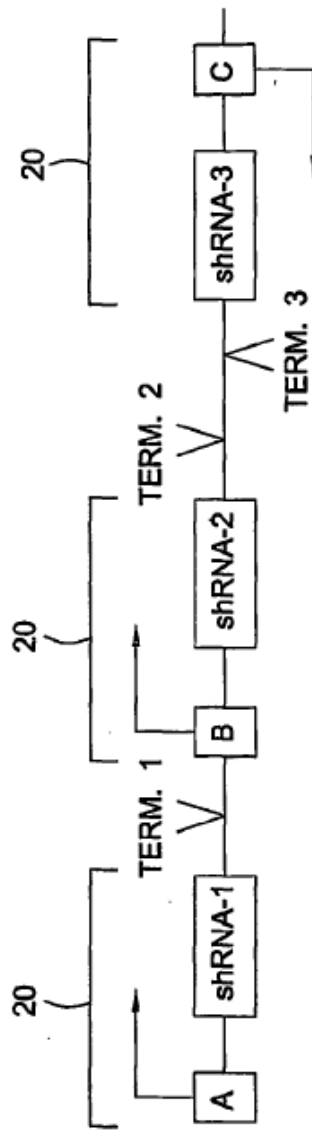


FIG. 3B

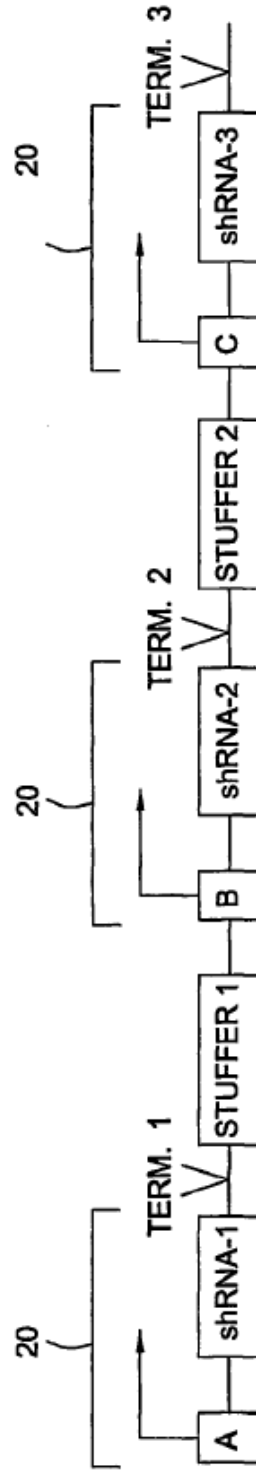


FIG. 3C



FIG. 3D

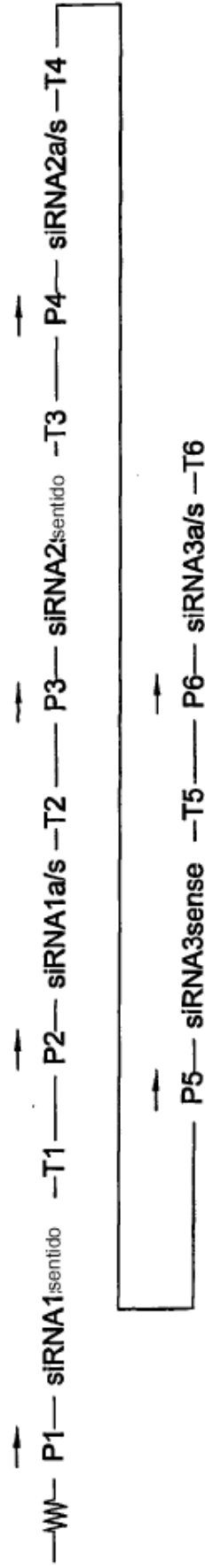


FIG. 3E

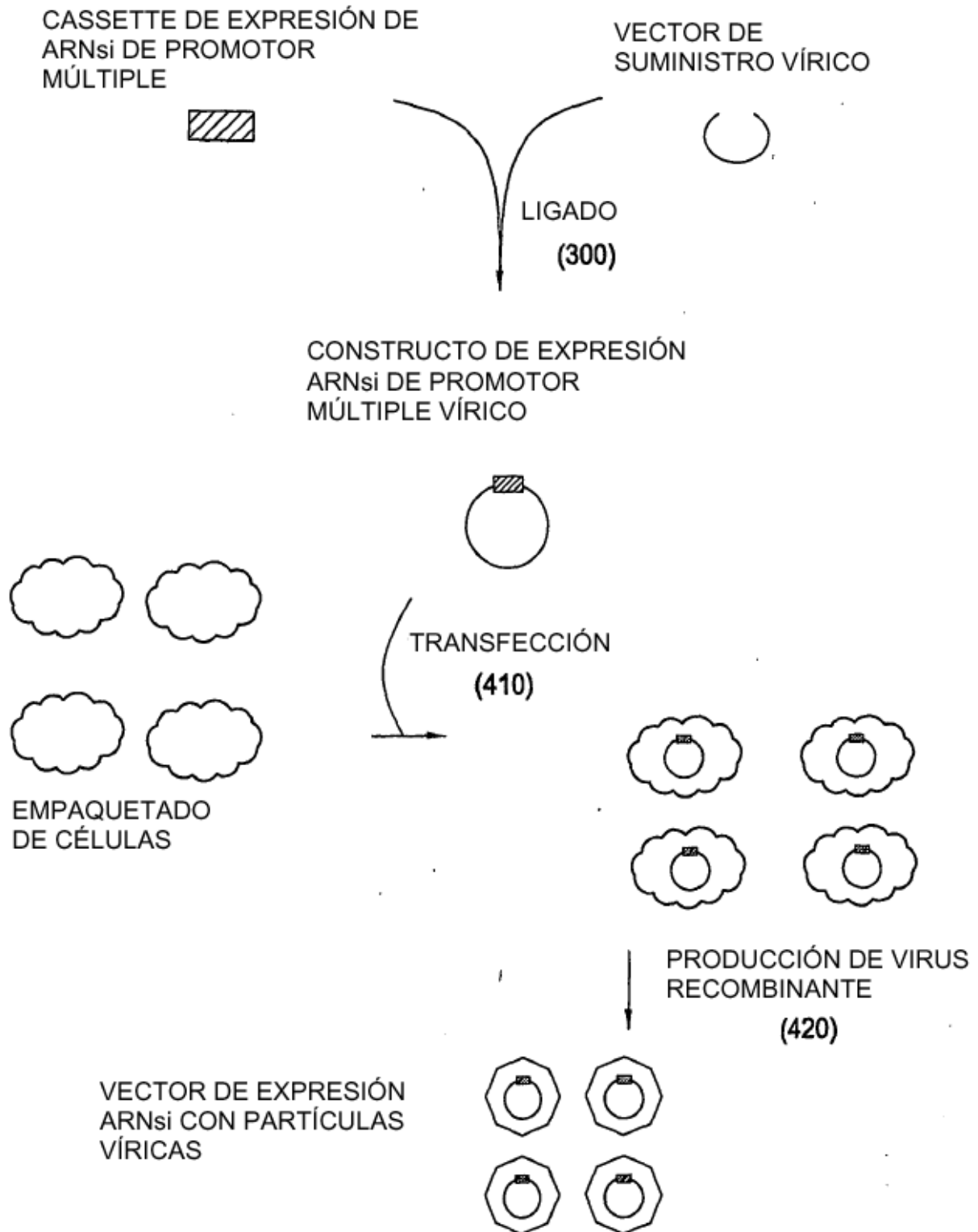


FIG. 4A

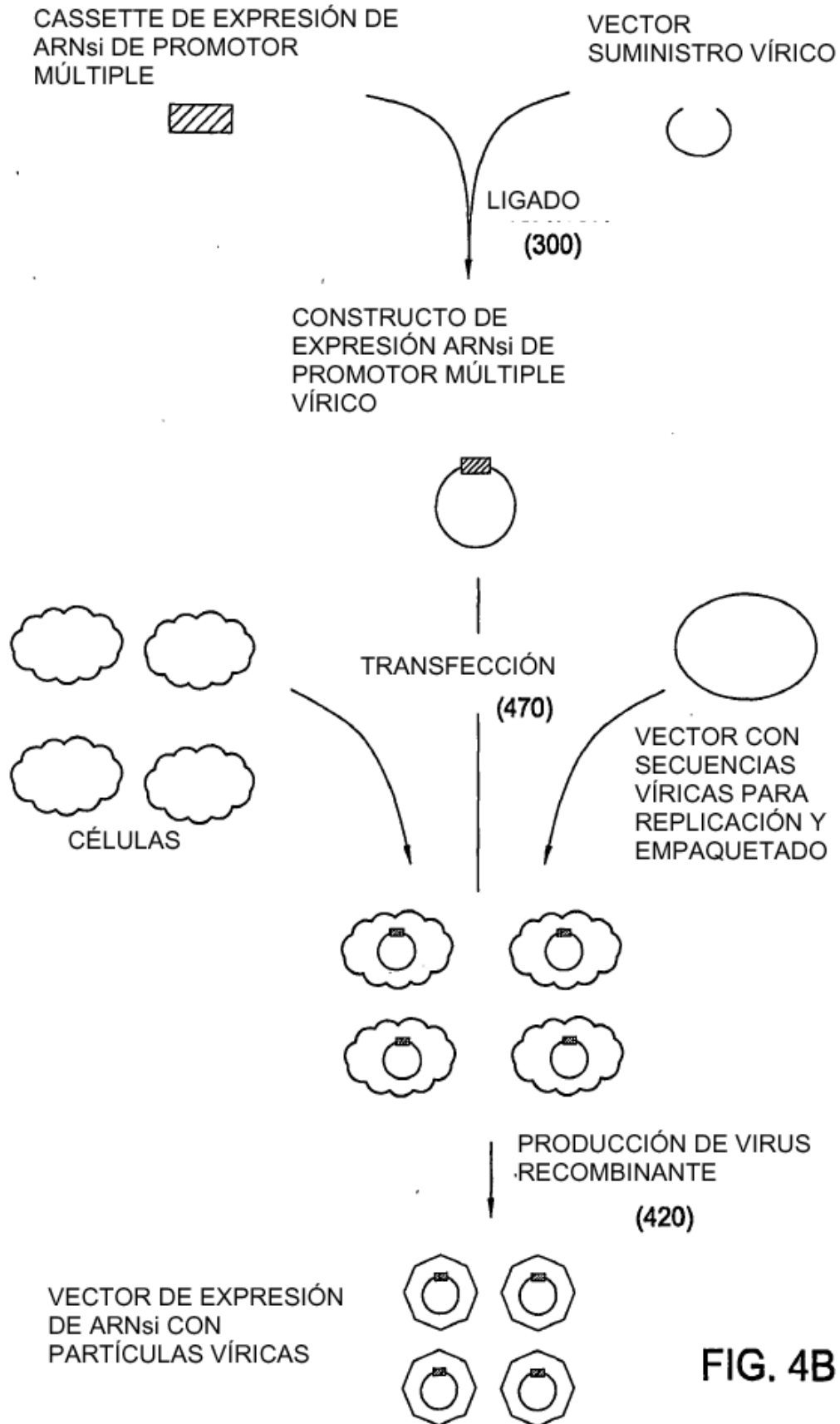


FIG. 4B

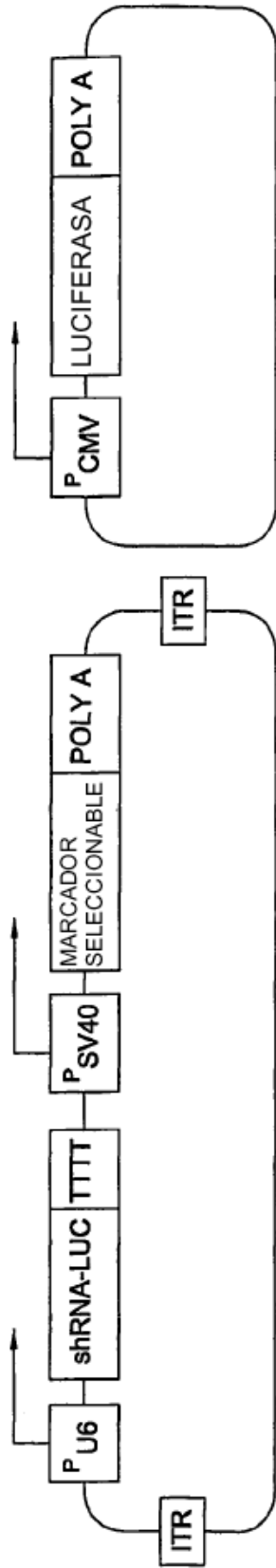


FIG. 5

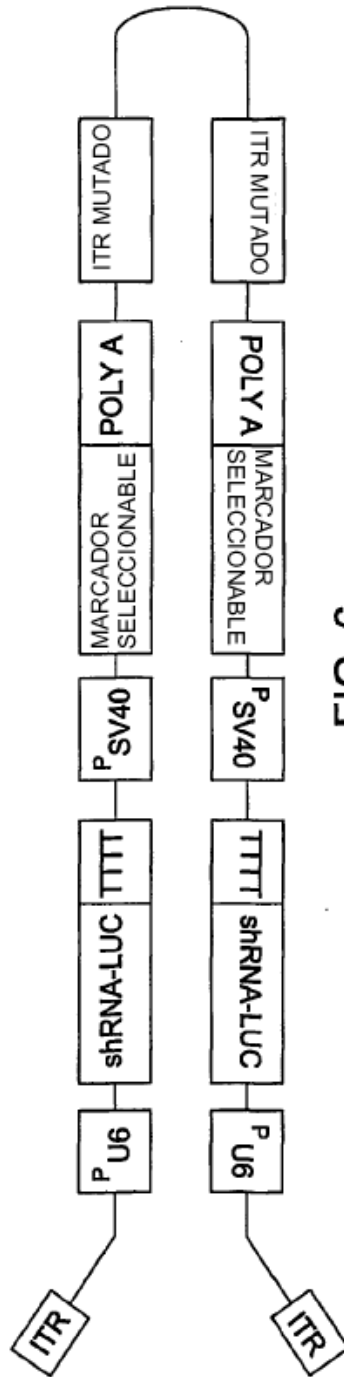


FIG. 6

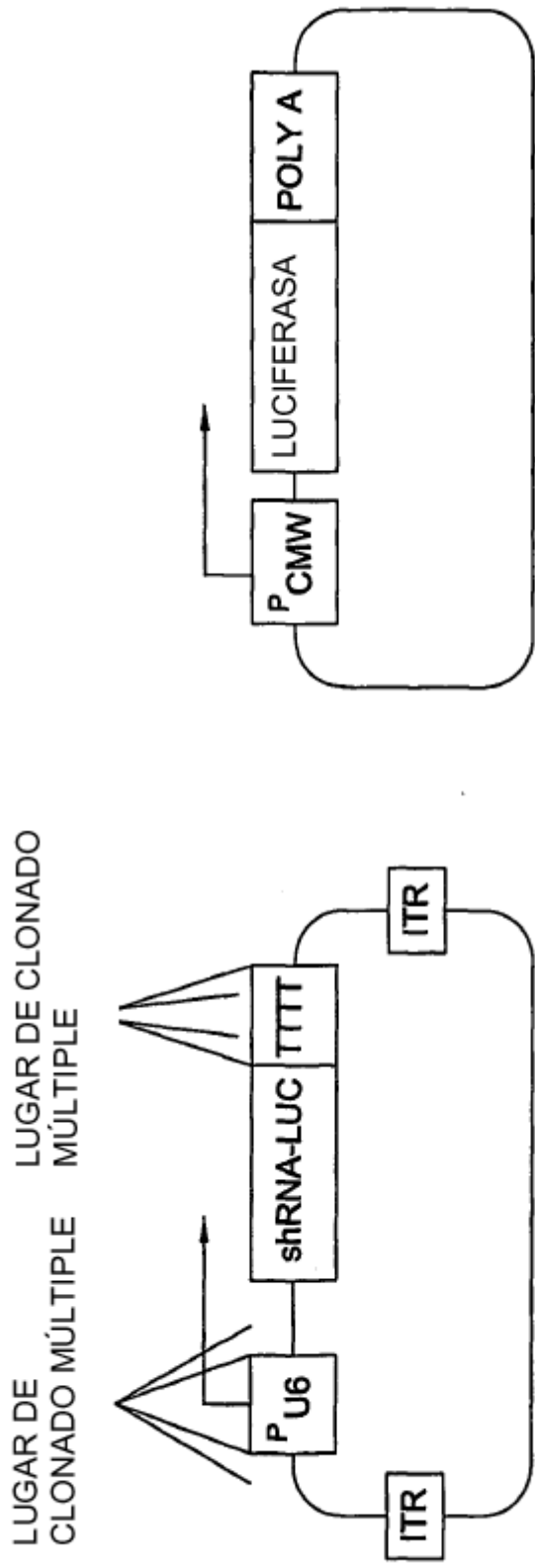


FIG. 7

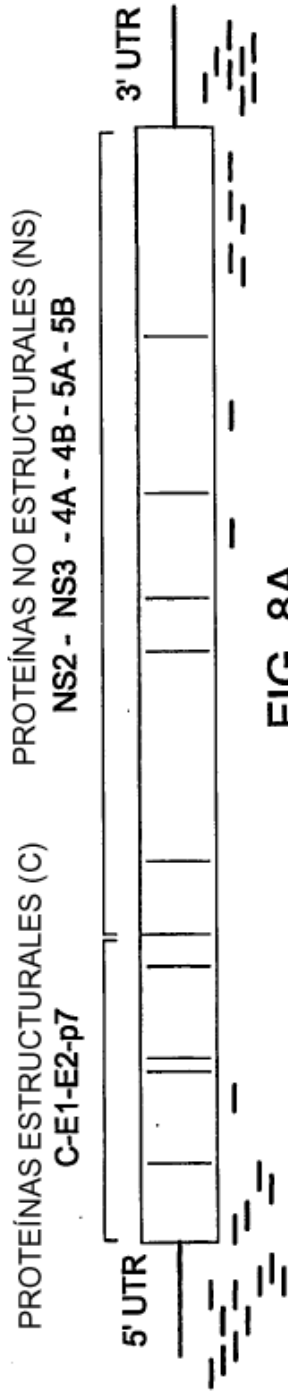


FIG. 8A

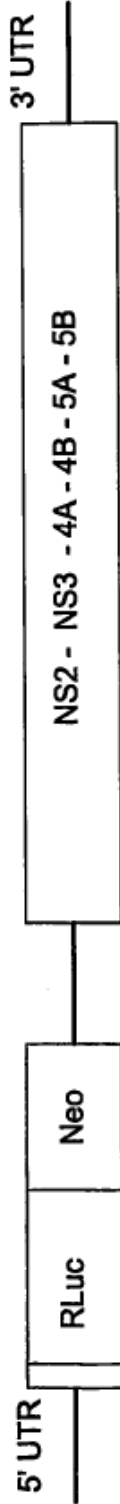


FIG. 8B



FIG. 8C

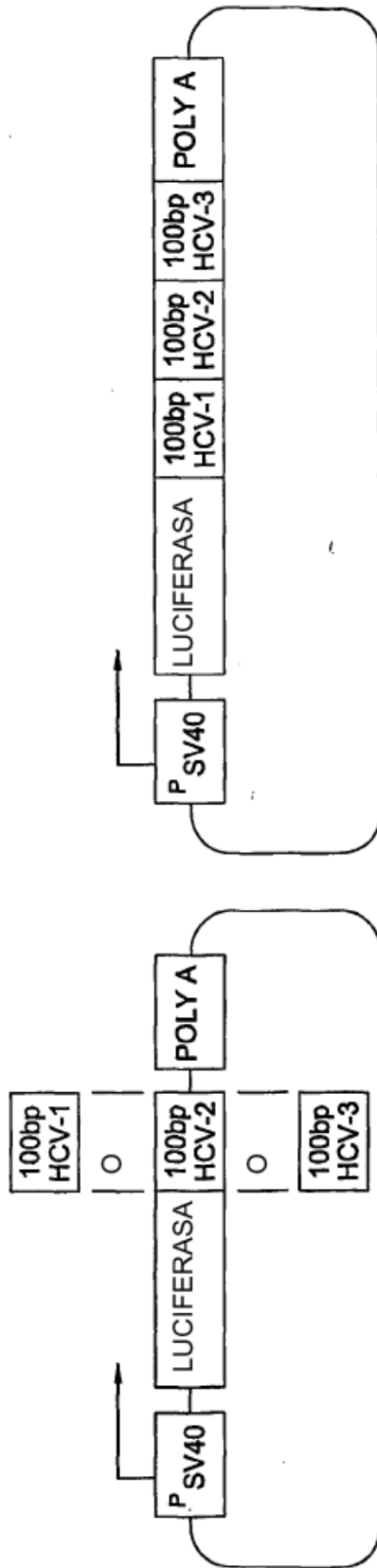


FIG. 9

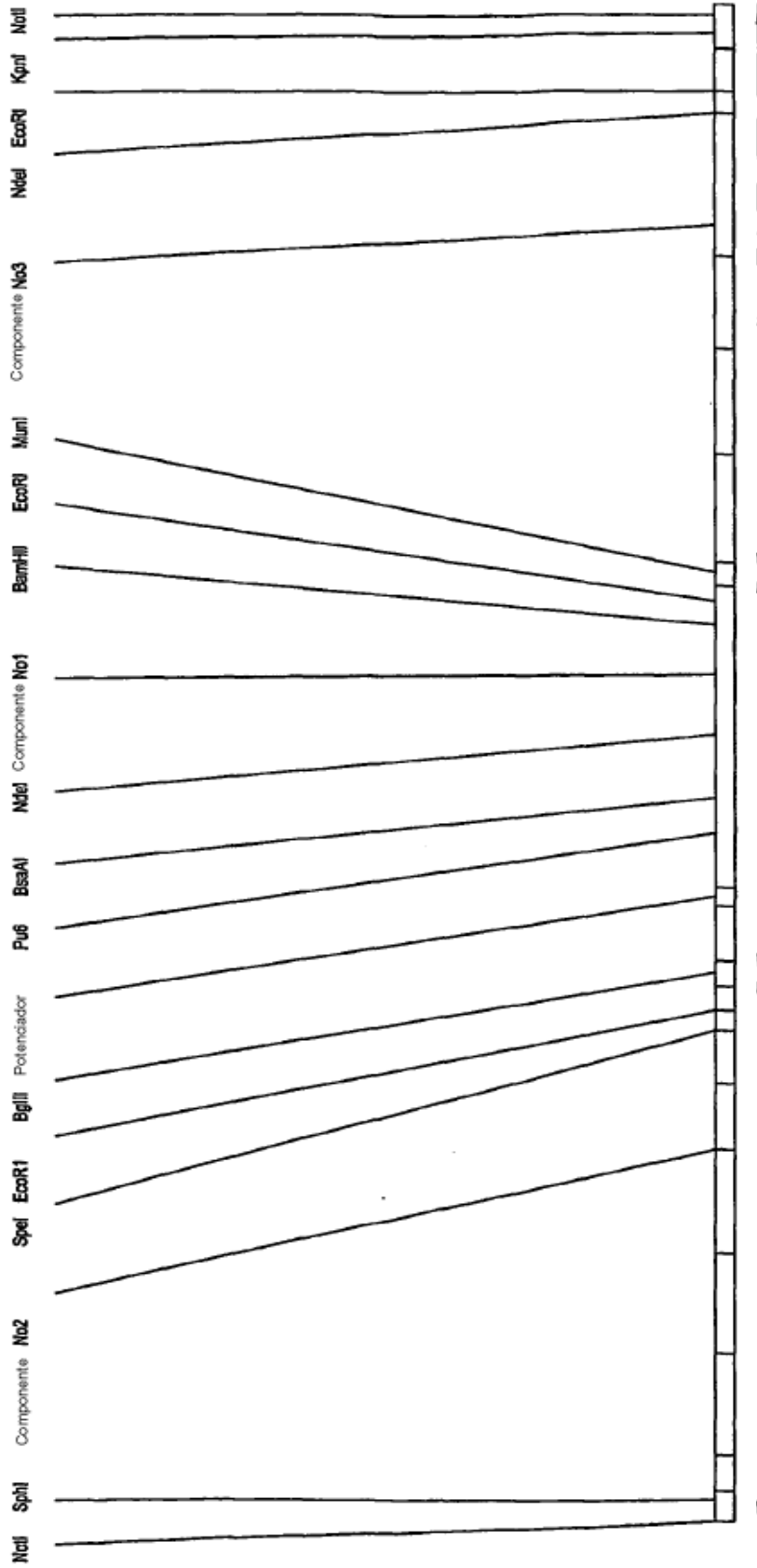


FIG. 10

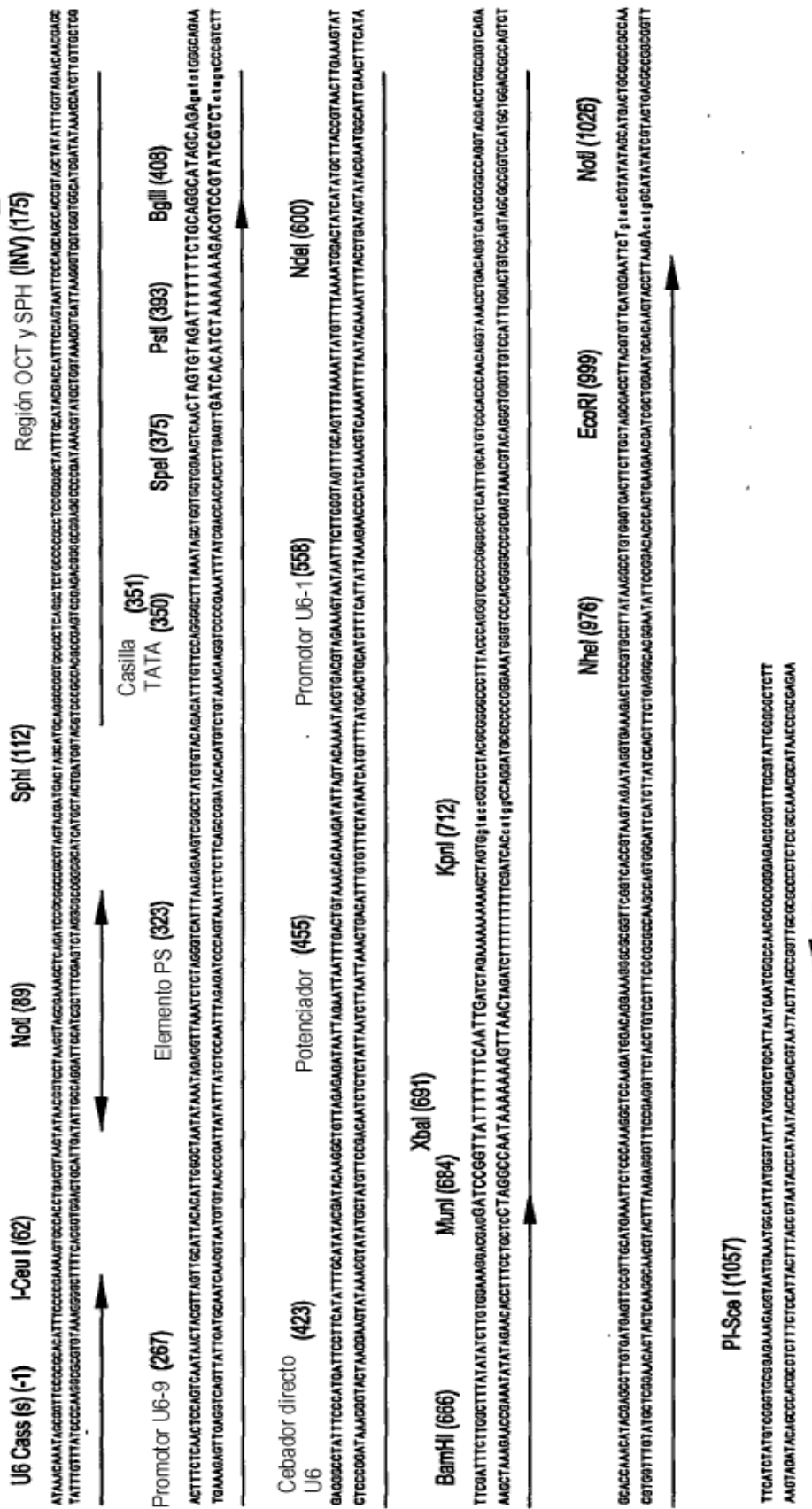
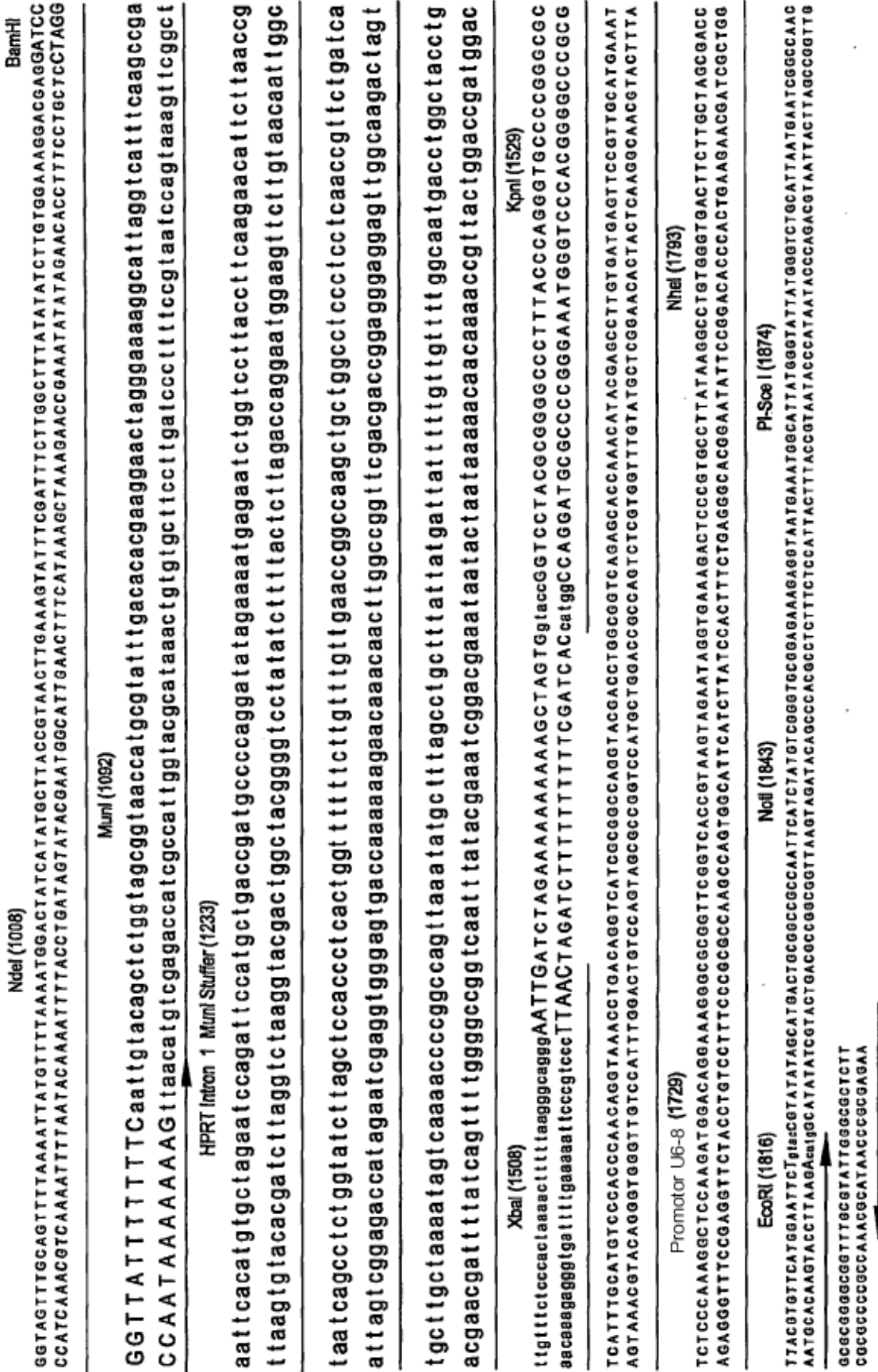


FIG. 11A

FIG. 11B



FIG. 11C



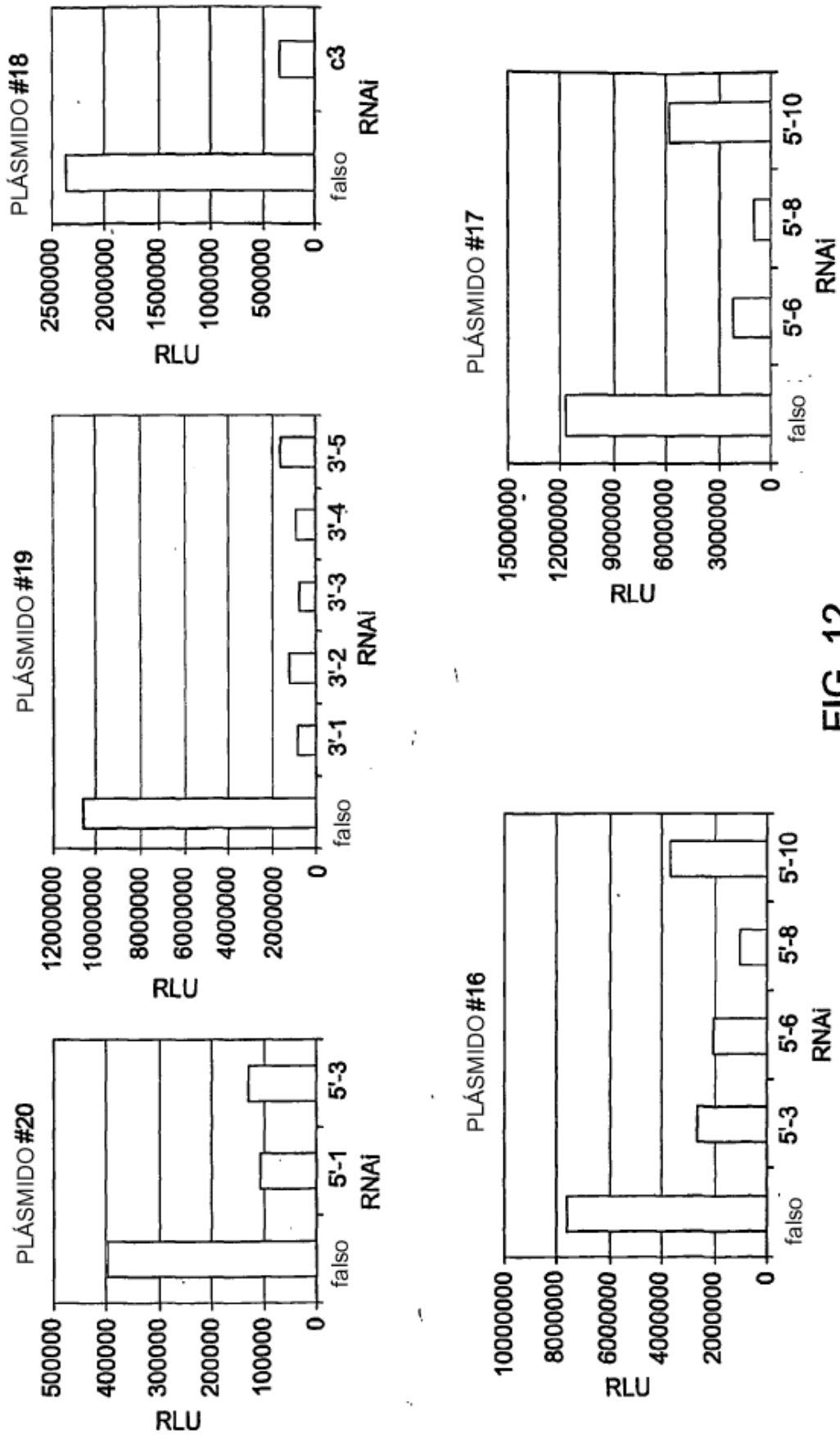


FIG. 12

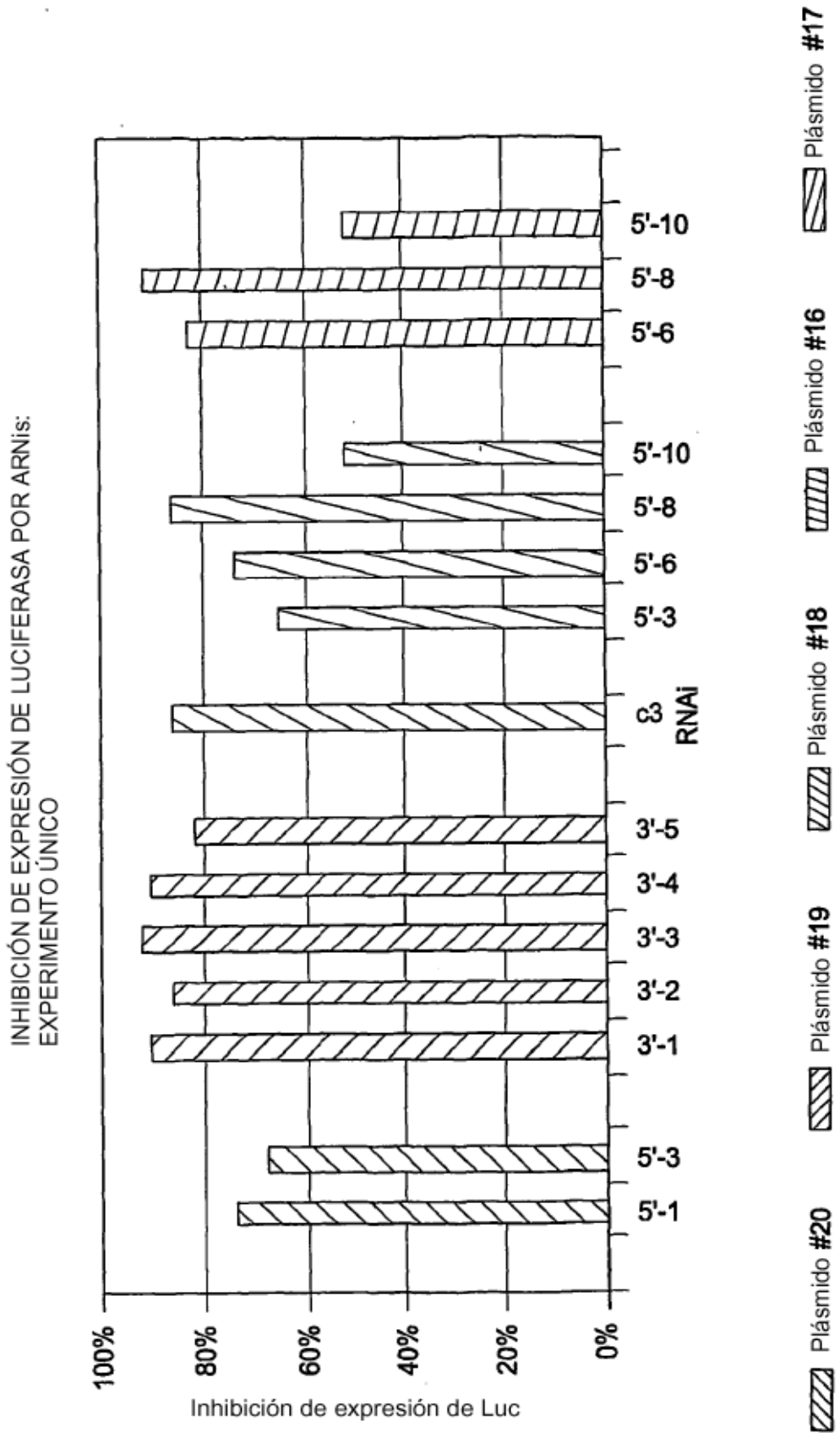


FIG. 13

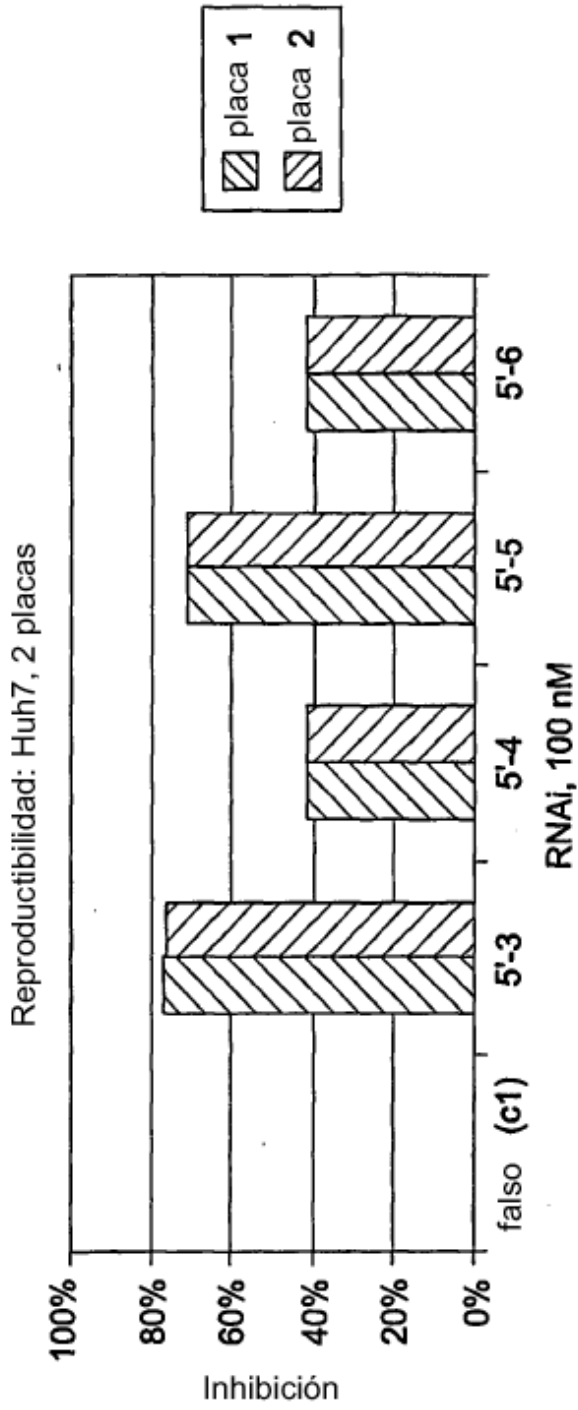


FIG. 14

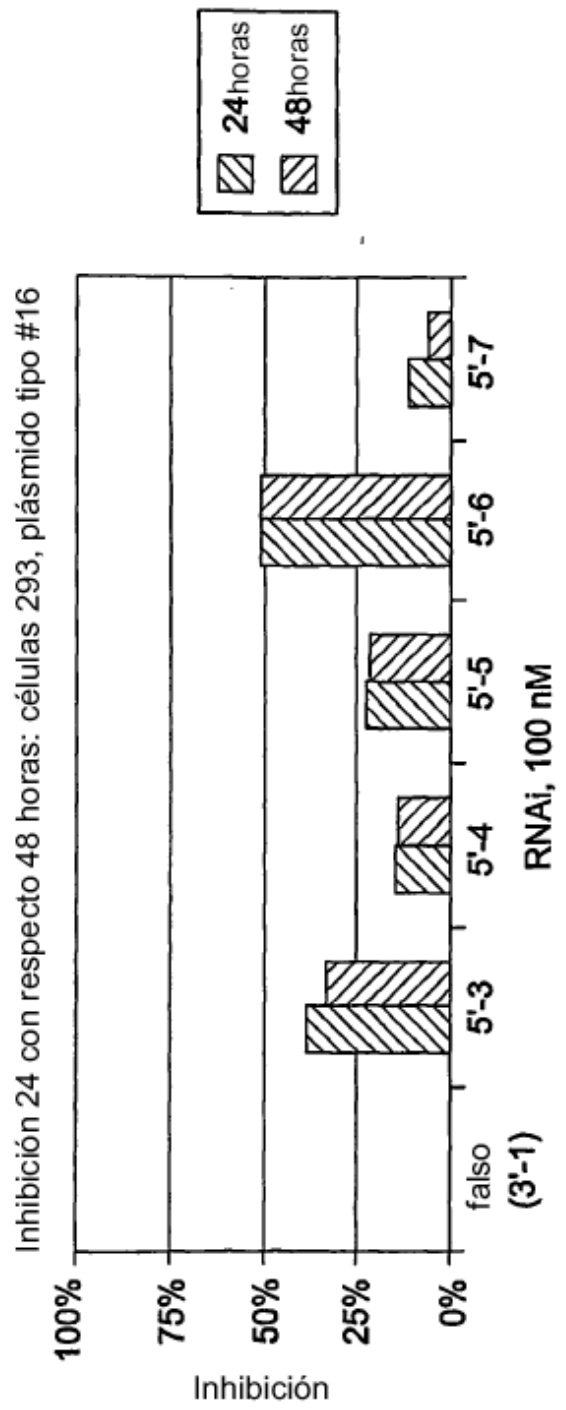


FIG. 15

Huh7: 44 respecto 72 horas

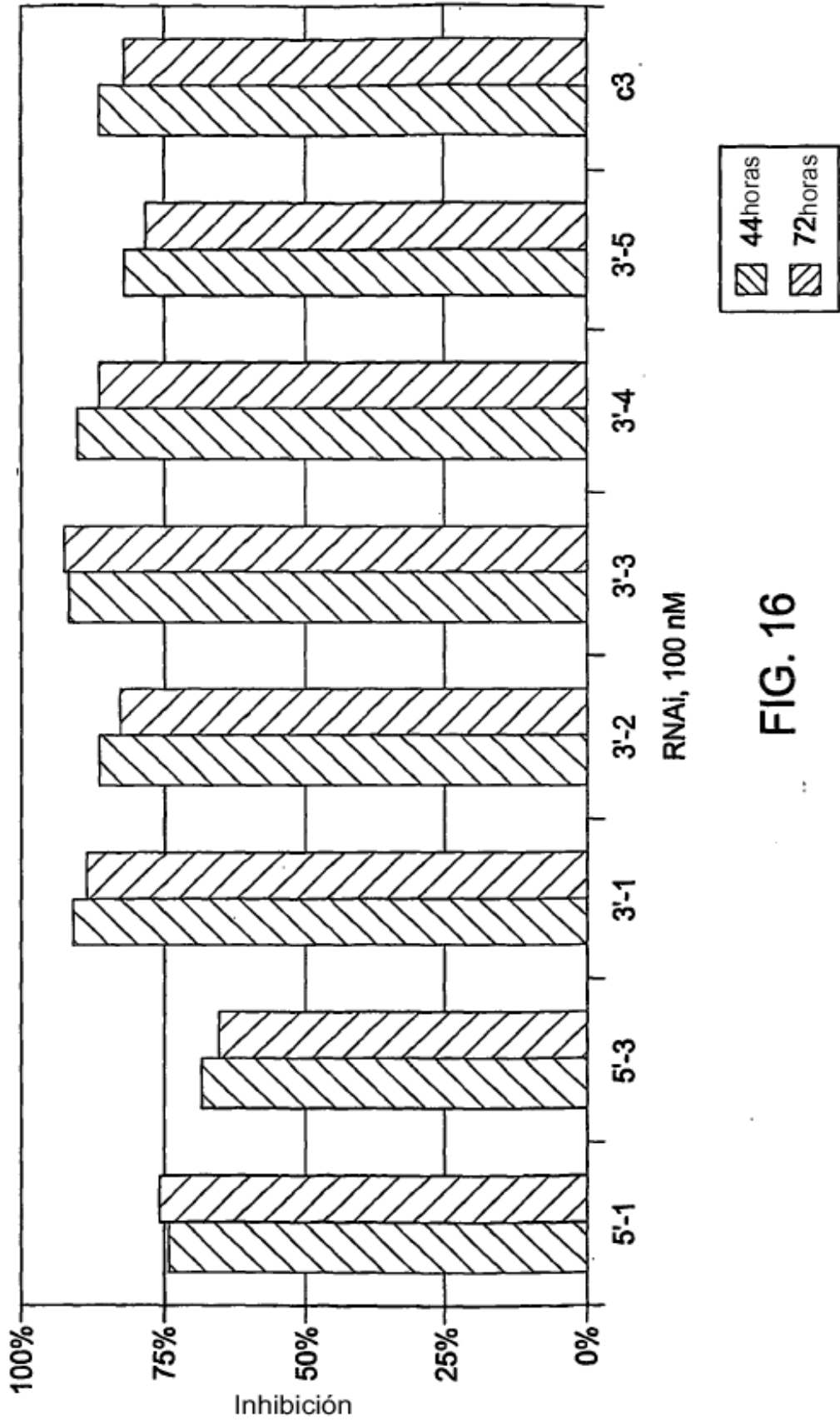
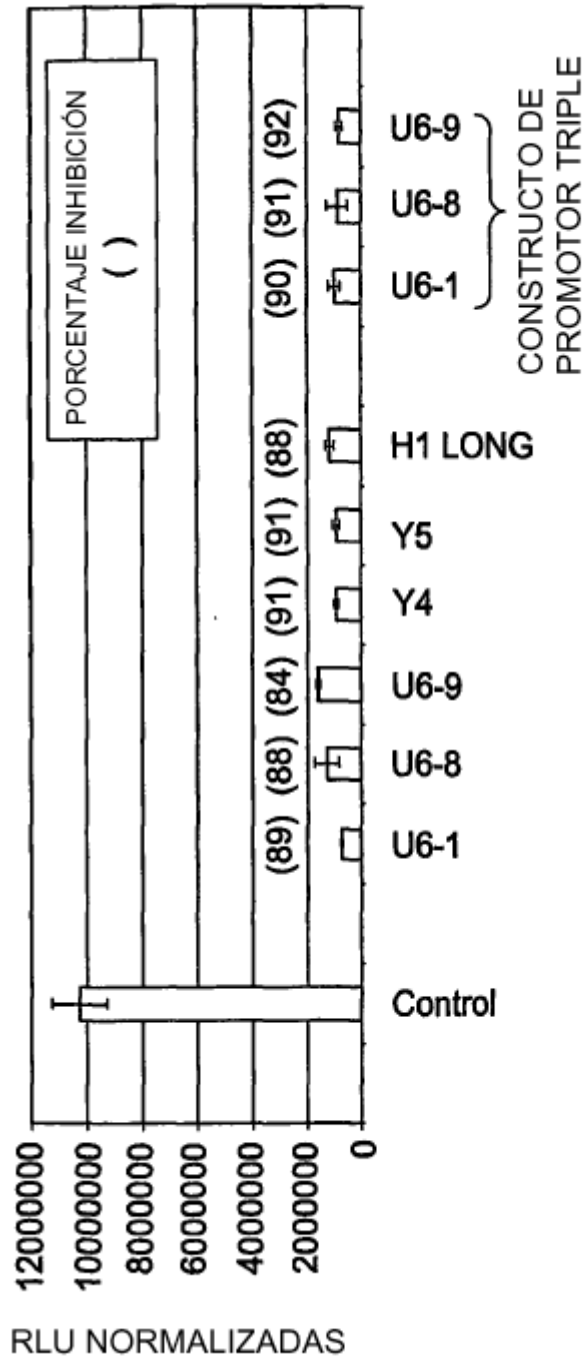
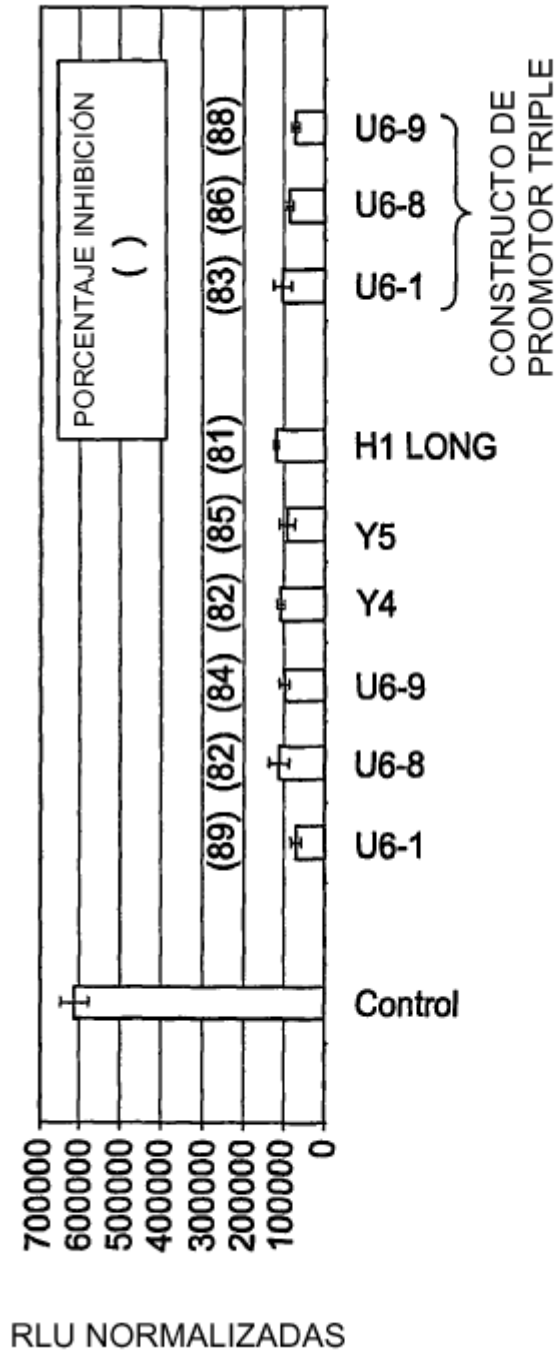


FIG. 16



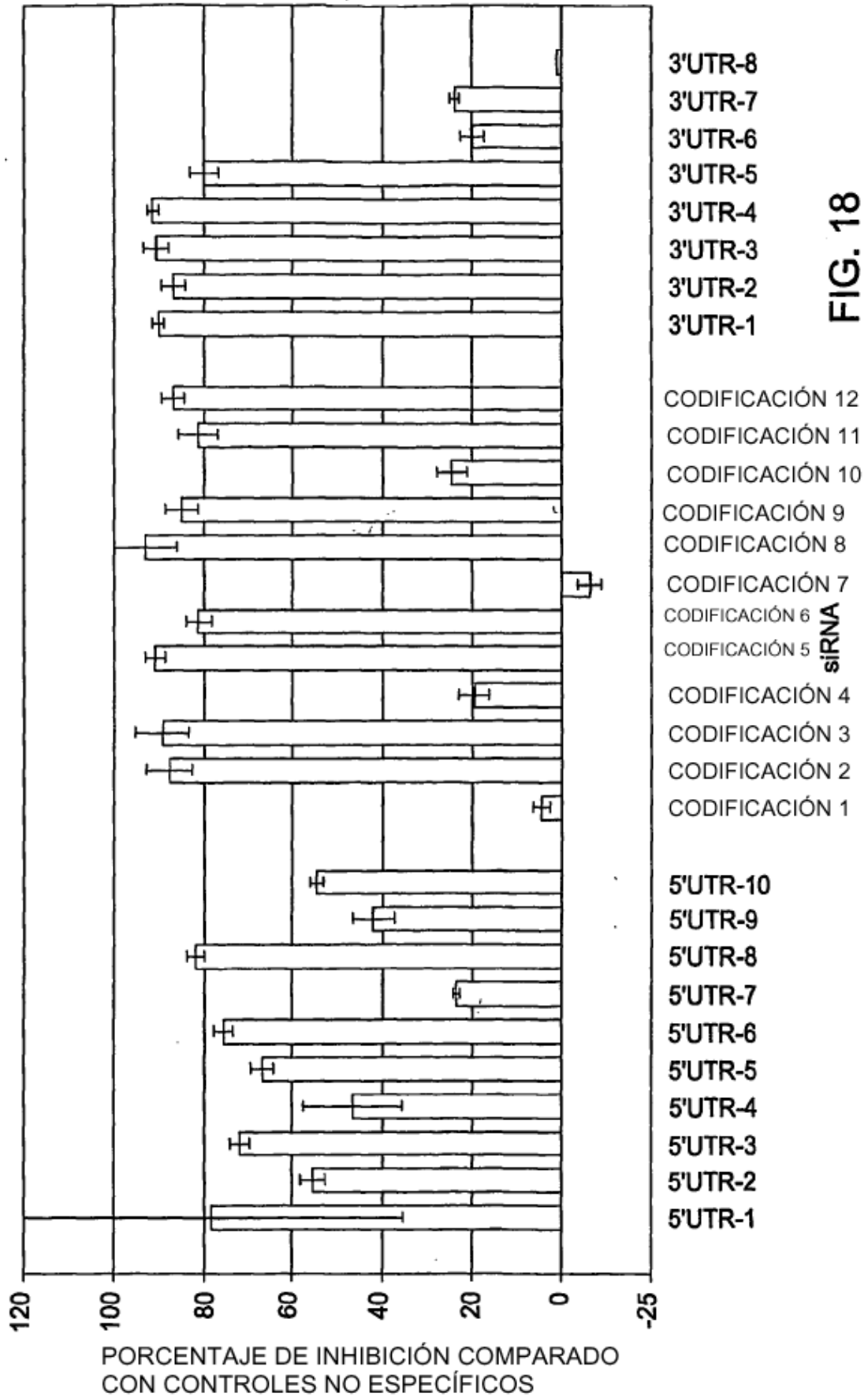
PROMOTOR

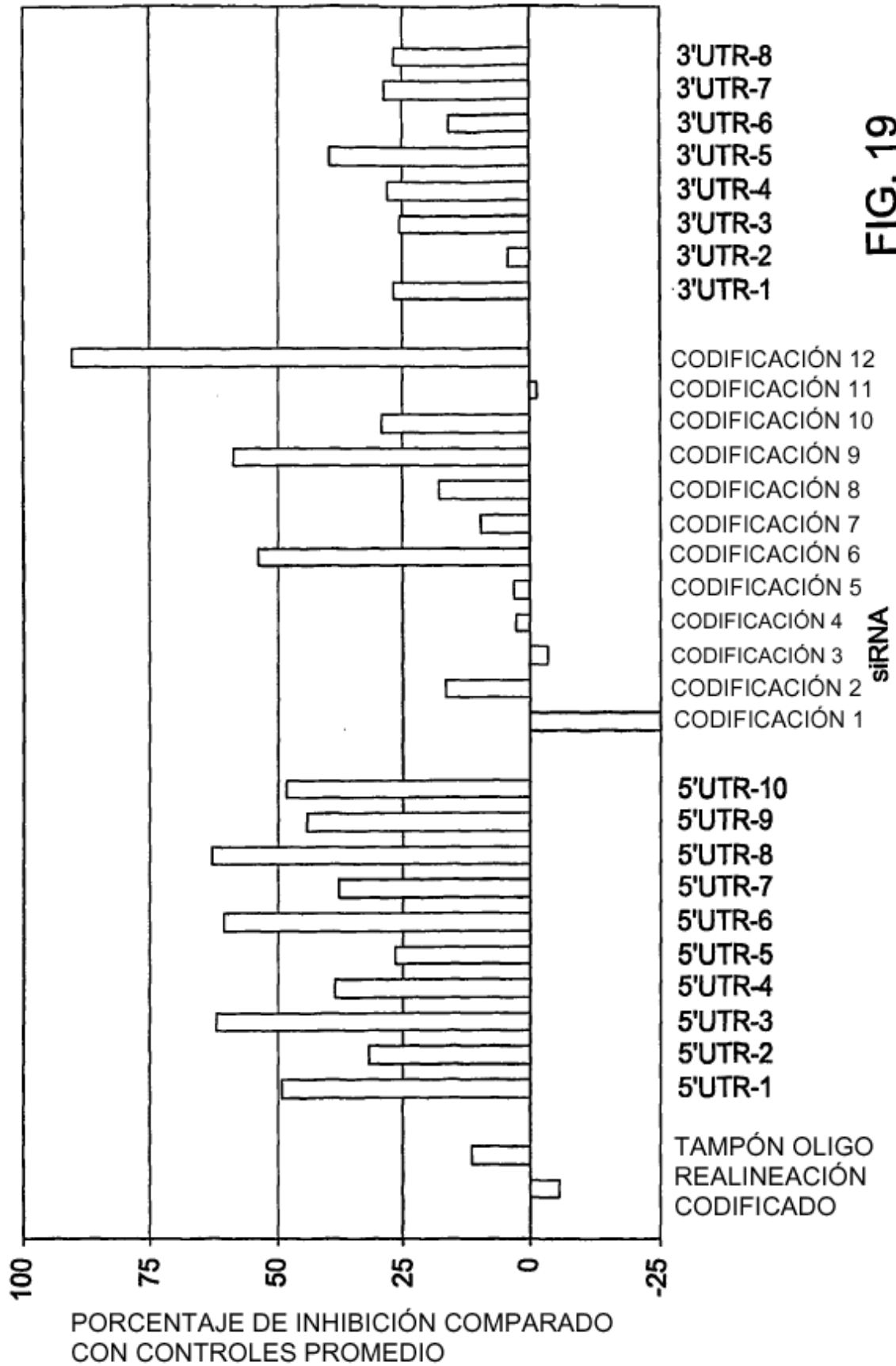
FIG. 17A



PROMOTOR

FIG. 17B





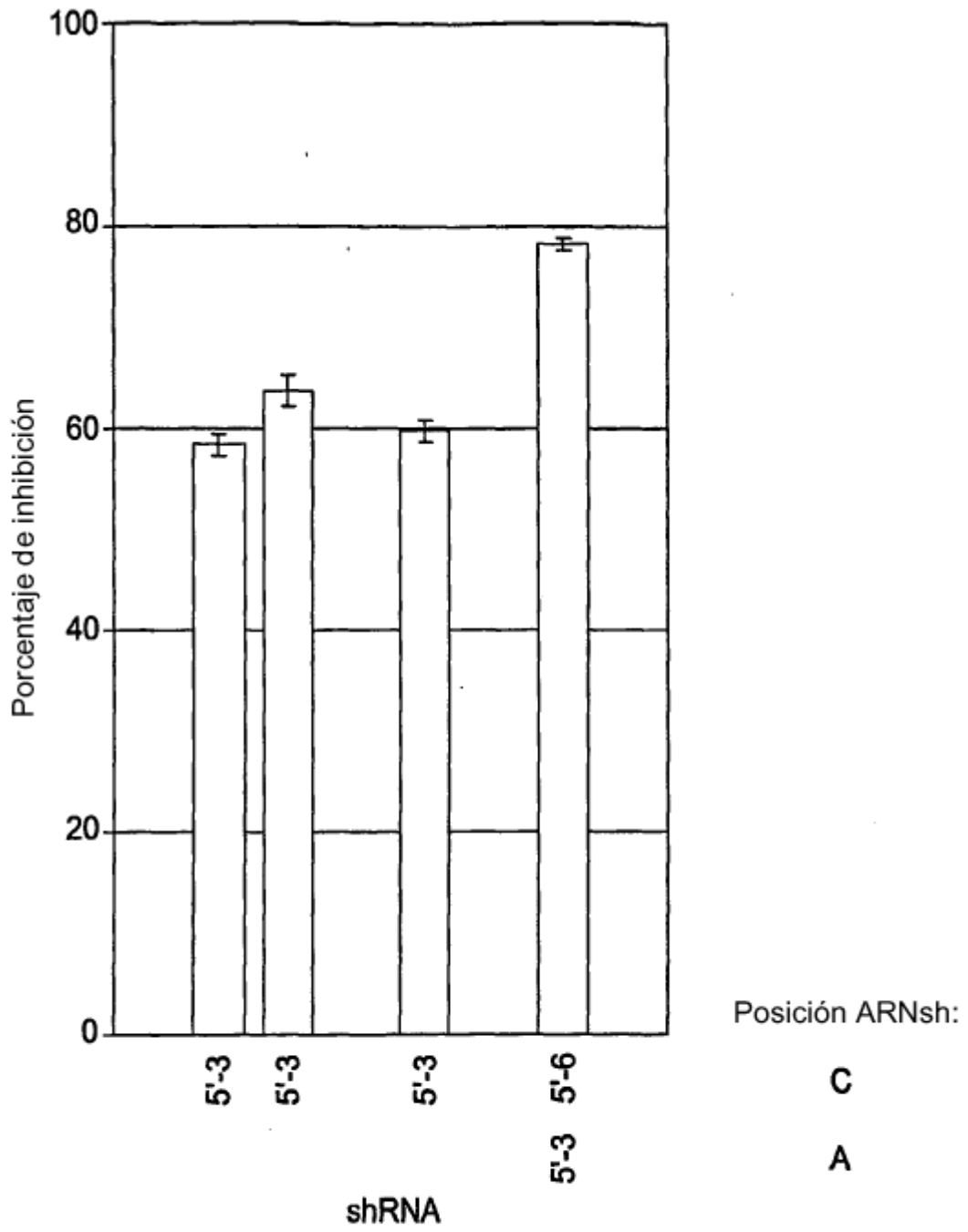


FIG. 20

