

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 775**

51 Int. Cl.:
A61K 39/385 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02761123 .5**
96 Fecha de presentación: **19.07.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1409506**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2004**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para la inhibición mediada por ARNi de la expresión génica en mamíferos**

30 Prioridad:
23.07.2001 US 307411 P
27.02.2002 US 360664 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.08.2012

73 Titular/es:
**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY
1705 EL CAMINO REAL
PALO ALTO, CA 94306-1106, US**

72 Inventor/es:
**KAY, Mark y
MCCAFFREY, Anton**

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

ES 2 386 775 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

Procedimientos y composiciones para la inhibición mediada por ARNi de la expresión génica en mamíferos

Campo de la invención

El campo de esta invención es el ARNi.

5 Antecedentes de la invención

El ARN bicatenario induce un silenciamiento génico potente y específico a través de un proceso al que se hace referencia como interferencia de ARN (ARNi) o silenciamiento génico postranscripcional (PTGS). El ARNi está mediado por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), una nucleasa multicomponente específica de secuencia que destruye ARN mensajeros homólogos al desencadenante del silenciamiento. Se sabe que RISC
10 contiene ARN cortos (de aproximadamente 22 nucleótidos) derivados del ARN bicatenario desencadenante.

El ARNi se ha convertido en el procedimiento de elección para las investigaciones de pérdida de función en numerosos sistemas, incluidos *C. elegans*, *Drosophila*, hongos, vegetales e incluso líneas celulares de mamífero. Para silenciar específicamente un gen en la mayoría de las líneas celulares de mamíferos, se usan ARN de interferencia pequeños (ARNsi) porque los ARNs (>30 pb) desencadenan la respuesta de interferón y provocan
15 silenciamiento génico no específico.

Hasta la fecha, los solicitantes no tienen conocimiento de que se haya informado de ninguna aplicación con éxito de tecnología de ARNi a organismos mamíferos no embrionarios. La demostración de que el ARNi funciona en organismos mamíferos no embrionarios proporcionaría una serie de importantes aplicaciones adicionales para la tecnología de ARNi, incluidas aplicaciones tanto de investigación como terapéuticas y, por lo tanto, es de gran
20 interés.

Literatura pertinente

El documento WO 01/68836. Véanse también: Bernstein et al., RNA (2001) 7: 1509-1521; Bernstein et al., Nature (2001) 409: 363-366; Billy et al., Proc. Nat'l Acad. Sci USA (2001) 98:14428-33; Caplan et al., Proc. Nat'l Acad. Sci USA (2001) 98: 9742-7; Carthew et al., Curr. Opin. Cell Biol (2001) 13: 244-8; Elbashir et al., Nature (2001) 411: 494-498; Hammond et al., Science (2001) 293:1146-50; Hammond et al., Nat. Ref. Genet. (2001) 2:110-119; Hammond et al., Nature (2000) 404:293-296; McCaffrey et al., Nature (2002): 418-38-39; y McCaffrey et al., Mol. Ther. (2002) 5:676-684; Paddison et al., Genes Dev. (2002) 16:948-958; Paddison et al., Proc. Nat'l Acad. Sci USA (2002) 99:1443-48; Sui et al., Proc. Nat'l Acad. Sci USA (2002) 99:5515-20.
25

Las patentes de EE. UU. de interés incluyen la 5.985.847 y la 5.922.687. También es de interés el documento WO/11092. Las referencias de interés adicionales incluyen: Acsadi et al., New Biol. (Ene. 1991) 3:71-81; Chang et al., J. Virol. (2001) 75:3469-3473; Hickman et al., Hum. Gen. Ther. (1994) 5:1477-1483; Liu et al., Gene Ther. (1999) 6:1258-1266; Wolff et al., Science (1990) 247: 1465-1468; y Zhang et al., Hum. Gene Ther. (1999) 10:1735-1737; y Zhang et al., Gene Ther. (1999) 7:1344-1349.
30

Sumario de la invención

La presente invención está definida por las reivindicaciones. En términos generales, se proporcionan composiciones para su uso en la modulación, p. ej., reducción de la expresión de secuencias codificantes en mamíferos. Se administra una cantidad eficaz de un agente de ARNi, p. ej., un ácido ribonucleico de interferencia (tal como un ARNsi o ARNsh) o uno de sus moldes de transcripción, p. ej., un ADN que codifica un ARNsh, a un mamífero no embrionario, p. ej., mediante un protocolo de administración hidrodinámica. También se proporcionan preparaciones farmacéuticas de agente de ARNi para su uso como se define por las reivindicaciones. Los procedimientos y composiciones descritas también en el presente documento pueden usarse en una variedad de aplicaciones diferentes, incluidas aplicaciones teóricas y terapéuticas.
40

Breve descripción de las figuras

La figura 1 proporciona construcciones de expresión empleadas en los experimentos de ARNi descritos más adelante.
45

Figuras 2A a 2D: interferencia de ARN en ratones adultos. Figura 2A) imágenes representativas de la luz emitida por ratones cotransfectados con el plásmido de luciferasa pGL3-Control y sin ARNsi (izquierda), con ARNsi de luciferasa (centro) o con ARNsi no relacionado (derecha). Una imagen en pseudocolor que representa la intensidad de la luz emitida (lo más intenso en rojo y lo menos en azul) superpuesta en una imagen de referencia en escala de grises (para orientación) muestra que el ARNi funciona en mamíferos adultos. Se coinyectaron cuarenta µg de ARNsi de 21 mers alineados (Dharmacon) en los hígados de ratones con los 2 µg de ADN de pGL3-Control y 800 unidades de ARNasina (Promega) en 1,8 ml de PBS en 5-7 segundos. Setenta y dos horas después de la inyección inicial, los ratones se anestesiaron y se les administraron 3 mg de luciferina por vía intraperitoneal 15 min antes de la formación de imágenes. Figura 2B) Resumen de datos de ARNsi. Los
50

ratones que recibieron el ARNsi de luciferasa emitieron significativamente menos luz que los controles no tratados. Se llevó a cabo un análisis ANOVA unidireccional en una prueba de Fisher a posteriori. Los grupos no tratados y con ARNsi no relacionado fueron estadísticamente similares. Figura 2C) El pShh1-Ff1 (centro), pero no el pShh1-Ff1rev (derecha), redujo la expresión de la luciferasa en ratones en comparación con el control no tratado (izquierda). Se coinyectaron 10 µg de pShh1-Ff1 o pShh1-rev con 40µg de pLuc-NS5B en 1,8 ml de PBS. Figura 2D) Cuantificación de los datos de pShh1. Los animales se trataron de acuerdo con las directrices del NIH para el cuidado de animales y las directrices de la Universidad de Stanford.

La figura 3 proporciona una representación esquemática de las construcciones empleadas en el ensayo de inhibición de VHC antisentido morfolino fosforamidato realizado en la sección experimental, más adelante. La figura 4 proporciona información básica sobre el mecanismo de los inhibidores antisentido.

Las figuras 5A a 5F proporcionan resultados gráficos de un ensayo de inhibición de VHC antisentido morfolino fosforamidato realizado de acuerdo con la invención de referencia.

Definiciones

Por comodidad, se recogen aquí ciertos términos empleados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha enlazado. Un tipo de vector es un vector integrado genómico, el "vector integrado", que puede integrarse en el ADN cromosómico de la célula huésped. Otro tipo de vector es un vector episómico, es decir, un ácido nucleico capaz de duplicarse extracromosómicamente en un huésped apropiado, p. ej., una célula huésped procariota o eucariota. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes a los que están enlazados de forma funcional se denominan en el presente documento "vectores de expresión". En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se usan indistintamente a menos que se desprenda lo contrario del contexto.

Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) y, cuando proceda, ácido ribonucleico (ARN). Asimismo, debería entenderse que el término incluye, según sea aplicable a la realización descrita, polinucleótidos monocatenarios (tales como sentido o antisentido) y bicatenarios.

Como se usa en el presente documento, el término "gen" o "gen recombinante" se refiere a un ácido nucleico que comprende un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de la presente invención, que incluye secuencias tanto exónicas como (opcionalmente) intrónicas. Un "gen recombinante" se refiere a un ácido nucleico que codifica tales polipéptidos reguladores, que puede incluir, opcionalmente, secuencias intrónicas que derivan de ADN cromosómico. El término "intrón" se refiere a una secuencia de ADN presente en un gen dado que no se traduce en proteína y que, en general, se encuentra entre exones. Como se usa en el presente documento, el término "transfección" significa la introducción de un ácido nucleico, p. ej., un vector de expresión, en una célula receptora mediante transferencia génica mediada por ácidos nucleicos.

Una "secuencia codificante de proteína" o una secuencia que "codifica" un polipéptido o péptido en particular, es una secuencia de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso del ARNm) en un polipéptido in vitro o in vivo cuando se sitúa bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de inicio en el extremo 5' terminal (amino) y un codón de detención de la traducción en el extremo 3' terminal (carboxilo). Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, ADNc de ARNm procariota o eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN procariota o eucariota e incluso secuencias de ADN artificial. Habitualmente, una secuencia de terminación de la transcripción se localizará en 3' con respecto a la secuencia codificante.

Del mismo modo, se pretende que, a menos que resulte evidente por el contexto, "codifica" incluya secuencias de ADN que codifican un polipéptido, como se usa normalmente el término, así como secuencias de ADN que se transcriben en moléculas inhibidoras antisentido.

El término "pérdida de función", en referencia a genes inhibidos por el procedimiento de ARNi de referencia, se refiere a una disminución del nivel de expresión de un gen cuando se compara con el nivel en ausencia del agente de ARNi.

El término "expresión" con respecto a una secuencia génica se refiere a la transcripción del gen y, si procede, a la traducción del transcrito de ARNm resultante en una proteína. Por tanto, como se desprenderá del contexto, la expresión de una secuencia que codifica una proteína es consecuencia de la transcripción y la traducción de la secuencia codificante.

"Células", "células huésped" o "células huésped recombinantes" son términos que se usan indistintamente en el presente documento. Se entiende que tales términos no sólo se refieren a la célula de referencia en particular, sino a la progenie o la progenie potencial de dicha célula. Dado que pueden producirse ciertas modificaciones en

generaciones sucesivas debidas, a mutaciones o bien a influencias ambientales, dicha progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula progenitora, pero se incluyen aun así dentro del alcance del término como se usa en el presente documento.

5 Con "virus recombinante" se quiere decir un virus que se ha modificado genéticamente, p. ej., mediante la adición o inserción de una construcción de ácido nucleico heteróloga en la partícula.

10 Como se usa en el presente documento, los términos "transducción" y "transfección" se reconocen en la técnica y significan la introducción de un ácido nucleico, p. ej., un vector de expresión, en una célula receptora mediante transferencia génica mediada por ácidos nucleicos. "Transformación", como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso en el que se cambia el genotipo de una célula como consecuencia de la incorporación celular de ADN o ARN exógeno y, por ejemplo, la célula transformada, expresa una construcción de ARNs.

"Transfección transitoria" se refiere a casos en los que el ADN exógeno no se integra en el genoma de una célula transfectada, p. ej., donde se transcribe ADN episómico en ARNm y se traduce en proteína.

Una célula se ha "transfectado de forma estable" con una construcción de ácido nucleico cuando la construcción de ácido nucleico puede heredarse por células hijas.

15 Como se usa en el presente documento, una "construcción de gen indicador" es un ácido nucleico que incluye un "gen indicador" enlazado de forma funcional a al menos una secuencia reguladora de la transcripción. La transcripción del gen indicador la controlan estas secuencias a las que está enlazado. La actividad de al menos una o más de estas secuencias de control puede regularse directa o indirectamente por la proteína receptora objetivo. Las secuencias promotoras con secuencias de control de la transcripción ejemplares. Un gen indicador debe incluir
20 una construcción de gen indicador promotora que se expresa de forma heteróloga en una célula.

25 Como se usa en el presente documento, "células transformadas" se refiere a células que se han convertido de forma espontánea a un estado de crecimiento ilimitado, es decir, que han adquirido la capacidad de crecer durante un número indefinido de divisiones en cultivo. Las células transformadas pueden caracterizarse por términos tales como neoplásicas, anaplásicas y/o hiperplásicas, con respecto a su pérdida de control del crecimiento. Para los propósitos de esta invención, se pretende que los términos "fenotipo transformado de células de mamífero malignas" y "fenotipo transformador" engloben, pero sin limitarse a, cualquiera de los siguientes rasgos fenotípicos relacionados con la transformación celular de células de mamíferos: inmortalización, transformación morfológica o de crecimiento y oncogenicidad, detectados por crecimiento celular prolongado en cultivo, crecimiento en medios semisólidos o crecimiento oncogénico en animales inmunoincompetentes o sinérgicos.

30 Como se usa en el presente documento, "que proliferan" y "proliferación" se refieren a células que sufren mitosis.

Como se usa en el presente documento, "células inmortalizadas" se refiere a células que se han modificado por medios químicos, genéticos y/o recombinantes, de manera que las células son capaces de crecer durante un número indefinido de divisiones celulares en cultivo.

35 El "estado de crecimiento" de una célula se refiere a la tasa de proliferación de la célula y al estado de diferenciación de la célula.

40 "Inhibición de la expresión génica" se refiere a la ausencia (o disminución apreciable) de la concentración de producto de proteína y/o de ARNm a partir de un gen objetivo. "Especificidad" se refiere a la capacidad para inhibir el gen objetivo sin efectos evidentes sobre otros genes de la célula. Las consecuencias de la inhibición pueden confirmarse mediante la evaluación de las propiedades externas de la célula u organismo (como se presenta más adelante en los ejemplos) o mediante técnicas bioquímicas tales como hibridación en solución de ARN, protección de nucleasas, hibridación de bandas northern, transcripción inversa, monitorización de la expresión génica con una microselección, unión a anticuerpos, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), transferencia de bandas western, radioinmunoensayo (RIA), otros inmunoensayos y análisis de células activadas por fluorescencia (FACS). Para la inhibición mediada por ARN en una línea celular o un organismo completo, se ensaya convenientemente la
45 expresión génica mediante el uso de un gen indicador o de resistencia a fármaco cuyo producto proteico se ensaye fácilmente. Tales genes indicadores incluyen acetohidroxiácido sintasa (AHAS), fosfatasa alcalina (FA), beta galactosidasa (LacZ), beta glucuronidasa (GUS), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína fluorescente verde (GFP), peroxidasa de rábano picante (HRP), luciferasa (Luc), nopalina sintasa (NOS), octopina sintasa (OCS) y sus derivados. Se dispone de numerosos marcadores seleccionables que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina,
50 cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfinotricina, puromicina y tetraciclina.

55 En función del ensayo, la cuantificación de la cantidad de expresión génica permite determinar un grado de inhibición que es superior al 10 %, 33 %, 50 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula no tratada de acuerdo con la presente invención. Dosis más bajas de agente activo administrado y tiempos más largos después de la administración del agente activo pueden dar lugar a inhibición en una fracción de células menor (p. ej., al menos el 10 %, 20 %, 50 %, 75 %, 90 % o 95 % de las células marcadas). La cuantificación de la expresión génica en una célula puede mostrar cantidades similares de inhibición en cuanto al nivel de acumulación de ARNm objetivo o traducción de proteína objetivo. Como ejemplo, la eficacia de la inhibición puede determinarse evaluando la cantidad

de producto génico en la célula: puede detectarse el ARNm con una sonda de hibridación que tenga una secuencia de nucleótidos fuera de la región usada para el ARN bicatenario inhibidor o puede detectarse el polipéptido traducido con un anticuerpo obtenido frente a la secuencia de esa región.

Descripción

- 5 En el presente documento también se describen procedimientos y composiciones para modular, p. ej., reducir, la expresión de secuencias codificantes en mamíferos. En los procedimientos descritos aquí, se administra una cantidad eficaz de un agente de ARNi, p. ej., un ácido ribonucleico de interferencia (tal como un ARNsi o ARNsh) o uno de sus moldes de transcripción, p. ej., un ADN que codifica un ARNsh, a un mamífero no embrionario, p. ej., mediante un protocolo de administración hidrodinámica. La invención proporciona También se proporcionan preparaciones farmacéuticas de agente de ARNi para su uso como se define en las reivindicaciones. Los procedimientos de referencia y composiciones descritas aquí se usan en una variedad de aplicaciones diferentes, incluidas aplicaciones teóricas y terapéuticas.

El alcance de la presente invención se establecerá mediante las reivindicaciones adjuntas.

- 15 En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/una", "uno/una" y "el/la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado con que los entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor que intervenga, hasta un décimo de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo, y cualquier otro valor indicado o que intervenga en el intervalo mencionado, se engloba dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse de forma independiente, en intervalos más pequeños y también se engloban dentro de la invención, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de dichos límites incluidos también se incluyen en la invención.

- 25 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado con que los entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

ARNi en mamíferos no embrionarios

- 30 Como se resume anteriormente, también se describen aquí procedimientos para realizar ARNi en mamíferos no embrionarios. Para describir adicionalmente este aspecto que también se describe en el presente documento, se describen en primer lugar los procedimientos de ARNi de referencia en mamíferos no embrionarios con gran detalle, seguido por una revisión de diversas aplicaciones representativas en las que se usan los procedimientos descritos también en el presente documento.

Procedimientos

- 35 Como se indica anteriormente, se describen en el presente documento procedimientos para emplear ARNi para modular la expresión de un gen o genes objetivo en un huésped mamífero no embrionario. La invención de referencia descrita proporciona procedimientos de reducción de la expresión de uno o más genes objetivo en un organismo huésped mamífero no embrionario. Con reducir la expresión se quiere decir que el nivel de expresión de una secuencia codificante o gen objetivo se reduce o inhibe al menos aproximadamente 2 veces, habitualmente al menos aproximadamente 5 veces, p. ej., 10 veces, 15 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces o más, en comparación con un control. La expresión del gen objetivo puede reducirse hasta tal punto que la expresión de la secuencia codificante/gen objetivo se inhiba efectivamente. Con modular la expresión de un gen objetivo se quiere decir modificar, p. ej., reducir, la transcripción/traducción de una secuencia codificante, p. ej., ADN genómico, ARN, etc., en un producto de polipéptido, p. ej., proteína, producto.

- 45 Además, en el presente documento se describen procedimientos para modular la expresión de un gen objetivo en un organismo mamífero no embrionario. Con organismo mamífero no embrionario se quiere decir un organismo o huésped mamífero que no es un embrión, es decir, que está en una etapa de desarrollo que es posterior en el tiempo a la etapa de desarrollo embrionario. Como tal, el organismo huésped puede ser un feto, pero en general es un organismo huésped en una etapa de desarrollo postnatal, p. ej., juvenil, adulta, etc.

- 50 En la puesta en práctica de los procedimientos que también se describe en el presente documento, se administra una cantidad eficaz de agente de ARNi al organismo huésped para modular la expresión de un gen objetivo de una forma deseable, p. ej., para lograr la reducción deseada de la expresión génica en una célula objetivo.

- 55 Con agente de ARNi se quiere decir un agente que modula la expresión de un gen objetivo mediante un mecanismo de interferencia de ARN. Los agentes de ARNi empleados pueden ser moléculas de ácido ribonucleico pequeñas (también denominadas en el presente documento ácidos nucleicos de interferencia), es decir, oligorribonucleótidos, que están presentes en estructuras dúplex, p. ej., dos oligorribonucleótidos distintos hibridados entre sí o un sólo

ribooligonucleótido que adopta una formación de horquilla pequeña para producir una estructura dúplex. Con oligorribonucleótido se quiere decir un ácido ribonucleico que no excede de aproximadamente 100 nt de longitud; y que normalmente no excede de aproximadamente 75 nt de longitud, donde la longitud en ciertas realizaciones es de menos de aproximadamente 70 nt. Cuando el agente de ARN es una estructura dúplex de dos ácidos ribonucleicos hibridados entre sí, p. ej., un ARNsi (tal como un ARNd-si como se describe en la solicitud en trámite con número de serie 60/377.704: cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia), la longitud del dúplex varía normalmente desde aproximadamente 15 hasta 30 pb, habitualmente desde aproximadamente 15 hasta 29 pb, donde las longitudes entre aproximadamente 20 y 29 pb, p. ej., 21 pb, 22 pb, pueden ser de particular interés. Cuando el agente de ARN es una estructura dúplex de un sólo ácido ribonucleico que está presente en una formación de horquilla, es decir, un ARNsh, la longitud de la parte hibridada de la horquilla normalmente es la misma que la proporcionada anteriormente para el tipo de agente de ARNsi o de 4 a 8 nucleótidos más larga. El peso de los agentes de ARNi varía normalmente desde aproximadamente 5.000 dalton hasta aproximadamente 35.000 dalton y puede ser de al menos aproximadamente 10.000 dalton y de menos de aproximadamente 27.500 dalton, a menudo de menos de aproximadamente 25.000 dalton.

En lugar de que el agente de ARNi sea un ácido ribonucleico de interferencia, p. ej., un ARNsi o un ARNsh como se describe anteriormente, el agente de ARNi puede codificar un ácido nucleico de interferencia, p. ej., un ARNsh, como se describe anteriormente. En otras palabras, el agente de ARNi puede ser un molde transcripcional del ácido ribonucleico de interferencia. En consecuencia, normalmente, el molde transcripcional es un ADN que codifica el ácido ribonucleico de interferencia. El ADN puede estar presente en un vector, donde se conocen una variedad de vectores diferentes en la técnica, p. ej., un vector plasmídico, un vector vírico, etc.

El agente de ARNi puede administrarse al huésped mamífero no embrionario usando cualquier protocolo adecuado, donde, normalmente, el protocolo empleado es un protocolo de administración de ácido nucleico, donde se conocen varios protocolos diferentes de este tipo en la técnica. El siguiente análisis proporciona una revisión de protocolos de administración de ácido nucleico representativos que pueden emplearse. Los ácidos nucleicos pueden introducirse en tejidos o células huésped mediante cualquier número de vías, incluidas la infección vírica, la microinyección o la fusión de vesículas. También puede usarse la inyección a chorro para administración intramuscular, como se describe por Furth et al. (1992), *Anal Biochem* 205:365-368. Los ácidos nucleicos pueden recubrirse sobre micropartículas de oro y administrarse por vía intradérmica mediante un dispositivo de bombardeo de partículas o "pistola génica", como se describe en la literatura (véase, por ejemplo, Tang et al. (1992), *Nature* 356:152-154), donde se recubren microproyectiles de oro con el ADN y después se bombardean en células epiteliales. Pueden usarse vectores de expresión para introducir los ácidos nucleicos en una célula. En general, estos vectores tienen sitios de restricción adecuados situados cerca de la secuencia promotora para permitir la inserción de secuencias de ácido nucleico. Pueden prepararse casetes de transcripción que comprenden una región de inicio de la transcripción, el gen objetivo o uno de sus fragmentos y una región de terminación de la transcripción. Los casetes de transcripción pueden introducirse en una variedad de vectores, p. ej., plásmidos, retrovirus, p. ej., lentivirus; adenovirus; y similares, donde los vectores pueden mantenerse transitoriamente o de forma estable en las células, habitualmente durante un periodo de al menos un día, más habitualmente durante un periodo de al menos varios días a varias semanas.

Por ejemplo, el agente de ARNi puede suministrarse directamente a, inyectarse en, el organismo huésped que contienen el gen objetivo. El agente puede introducirse directamente en la célula (es decir, intracelularmente); o introducirse extracelularmente en una cavidad, espacio intersticial, en la circulación de un organismo, introducirse oralmente, etc. Los procedimientos para la introducción oral incluyen mezclar directamente el ARN con comida del organismo. Los procedimientos físicos de introducción de ácidos nucleicos incluyen la inyección directamente en la célula o la inyección extracelular en el organismo de una solución de ARN. El agente puede introducirse en una cantidad que permita la administración de al menos una copia por célula. Las dosis más altas (p. ej., al menos 5, 10, 100, 500 o 1000 copias por célula) del agente pueden proporcionar una inhibición más eficaz; las dosis más bajas también pueden ser útiles para aplicaciones específicas.

Se puede emplear un protocolo de administración hidrodinámica de ácidos nucleicos. Cuando el agente es un ácido ribonucleico, el protocolo de administración hidrodinámica de ácido ribonucleico descrito en detalle a continuación es de particular interés. Cuando el agente es un ácido desoxirribonucleico, los protocolos de administración hidrodinámica de ácido desoxirribonucleico descritos en Chang et al., *J. Virol.* (2001) 75:3469-3473; Liu et al., *Gene Ther.* (1999) 6:1258-1266; Wolff et al., *Science* (1990) 247: 1465-1468; Zhang et al., *Hum. Gene Ther.* (1999) 10:1735-1737; y Zhang et al., *Gene Ther.* (1999) 7: 1344-1349; son de interés.

Los protocolos de administración de ácidos nucleicos de interés adicionales incluyen, pero no se limitan a: los descritos en las patentes de EE. UU. de interés que incluyen la 5.985.847 y la 5.922.687; el documento WO/11092; Acsadi et al., *New Biol.* (1991) 3:71-81; Hickman et al., *Hum. Gen. Ther.* (1994) 5:1477-1483; y Wolff et al., *Science* (1990) 247: 1465-1468; etc.

En función de la naturaleza del agente de ARNi, el/los agente(s) activo(s) puede(n) administrarse al huésped usando cualquier medio adecuado capaz de dar lugar a la modulación deseada de la expresión génica. Por tanto, el agente puede incorporarse en una variedad de formulaciones para administración terapéutica. Más particularmente, los agentes de la presente invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas mediante combinación con

5 transportadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables y pueden formularse en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyectables, inhalables y aerosoles. Como tal, la administración de los agentes puede lograrse de varias formas, incluida la administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intratraqueal, etc.

En formas de dosificación farmacéuticas, los agentes pueden administrarse solos o asociados de forma apropiada, así como combinados, de forma apropiada con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los siguientes procedimientos y excipientes son meramente ejemplares y no son en modo alguno limitantes.

10 Para preparaciones orales, los agentes pueden usarse solos o en combinación con aditivos apropiados para preparar comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábiga, almidón de maíz o gelatinas; con disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa sódica; con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y, si se desea, con diluyentes, agentes tamponadores, agentes humectantes, conservantes y agentes aromatizantes.

15 Los agentes pueden formularse en preparaciones para inyección mediante su disolución, suspensión o emulsión en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceite vegetal u otros aceites similares, glicéridos ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y, si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizantes y conservantes.

20 Los agentes pueden utilizarse en formulación de aerosol para administrarse mediante inhalación. Los compuestos de la presente invención pueden formularse en propulsores presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

25 Además, los agentes pueden prepararse como supositorios mezclando con una variedad de bases tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por vía rectal por medio de un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, Carbowax y polietilenglicoles, que se funden a la temperatura corporal, pero solidifican a temperatura ambiente.

30 Pueden proporcionarse formas de dosificación unitarias para administración oral o rectal tales como jarabes, elixires y suspensiones, en las que cada unidad de dosificación, por ejemplo, cucharadita, cucharada sopera, comprimido o supositorio, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más inhibidores. Del mismo modo, las formas de dosificación unitarias para inyección o administración intravenosa pueden comprender el/los inhibidor(es) en una composición como una solución en agua estéril, solución salina normal u otro transportador farmacéuticamente aceptable.

35 El término "forma de dosificación unitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuestos de la presente invención calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las formas de dosificación unitarias novedosas de la presente invención dependen del compuesto particular empleado y el efecto que se quiere lograr, y de la farmacodinámica asociada a cada compuesto en el huésped.

40 Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, transportadores o diluyentes, están disponibles fácilmente para el público. Además, las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste del pH y de tamponación, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizantes, agentes humectantes y similares, están disponibles fácilmente para el público.

45 Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que las concentraciones de dosis pueden variar en función del compuesto específico, la naturaleza del vehículo de administración y similares. Las dosificaciones preferidas para un compuesto dado son fácilmente determinables por los expertos en la técnica mediante una variedad de medios.

La administración de una cantidad eficaz de un agente de ARNi a un huésped mamífero no embrionario de acuerdo con lo descrito anteriormente, da como resultado una modulación de la expresión de gen(es) objetivo, p. ej., una reducción de la expresión de gen(es) objetivo, como se describe anteriormente.

50 Los procedimientos descritos anteriormente funcionan en cualquier mamífero, donde los mamíferos representativos de interés incluyen, pero no se limitan a: ungulados o animales con pezuñas, p. ej., ganado vacuno, cabras, cerdos, ovejas, etc.; roedores, p. ej., hámsteres, ratones, ratas, etc.; lagomorfos, p. ej., conejos; primates, p. ej., monos, babuinos, seres humanos, etc.; y similares.

55 Los procedimientos descritos anteriormente pueden usarse en una variedad de aplicaciones diferentes, de las que se describen tipos representativos con mayor detalle a continuación.

Utilidad

Los procedimientos descritos también en el presente documento pueden usarse en una variedad de aplicaciones diferentes, donde las aplicaciones representativas incluyen aplicaciones tanto teóricas/de investigación como terapéuticas. Cada uno de estos tipos de aplicaciones representativas se describe a continuación en mayor profundidad.

Aplicaciones teóricas/de investigación

Los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse en una variedad de tipos diferentes de aplicaciones teóricas, de investigación, en las que se desea modular la expresión de uno o más genes objetivo (secuencias codificantes) en un huésped mamífero, p. ej., para determinar la función de un gen/secuencia codificante objetivo en un huésped mamífero. Los procedimientos pueden usarse en particular en ensayos de tipo "pérdida de función", donde se emplean los procedimientos para reducir o disminuir o inhibir la expresión de uno o más genes/secuencias codificantes en un huésped mamífero.

Como tal, una utilidad representativa descrita también en el presente documento es como procedimiento de identificación de función génica en un mamífero no embrionario, donde se administra un agente de ARNi a un mamífero de acuerdo con la presente invención con el fin de inhibir la actividad de un gen objetivo de función desconocida previamente. En lugar del aislamiento largo y laborioso de mutantes mediante selección genética tradicional, la genómica funcional que usa los procedimientos de referencia determina la función de genes no caracterizados administrando un agente de ARNi para reducir la cantidad y/o modificar la secuencia temporal de la actividad del gen objetivo. Tales procedimientos pueden usarse en la determinación de objetivos potenciales de compuestos farmacéuticos, la comprensión de acontecimientos normales y patológicos asociados al desarrollo, la determinación de rutas de señalización responsables del desarrollo postnatal/envejecimiento y similares. La velocidad creciente de adquisición de información de secuencias de nucleótidos a partir de fuentes genómicas y de genes expresados, incluidas secuencias completas de genomas de mamíferos, puede acoplarse con el uso de los procedimientos de referencia para determinar la función génica en un organismo mamífero vivo. La preferencia de diferentes organismos por el uso de codones particulares, la búsqueda en bases de datos de secuencias de productos génicos relacionados, la correlación del mapa de unión de rasgos genéticos con el mapa físico del que derivan las secuencias de nucleótidos y los procedimientos de inteligencia artificial pueden usarse para definir posibles marcos de lectura abiertos de las secuencias de nucleótidos adquiridas en tales proyectos de secuenciación.

Un ensayo representativo sencillo inhibe la expresión génica de acuerdo con la secuencia parcial disponible a partir de una etiqueta de secuencia expresada (EST). Modificaciones funcionales en el crecimiento, el desarrollo, el metabolismo, la resistencia a enfermedades u otros procesos biológicos indicarían un papel normal del producto génico de la EST. La función del gen objetivo puede ensayarse a partir de los efectos que tiene sobre el mamífero cuando se inhibe la actividad del gen.

Si se determina que una característica de un organismo está genéticamente ligada a un polimorfismo a través de análisis de RFLP o QTL, los procedimientos descritos también en el presente documento pueden usarse para aumentar los conocimientos acerca de si ese polimorfismo genético podría ser directamente responsable de la característica. Por ejemplo, pueden emplearse un fragmento que define el polimorfismo genético o secuencias próximas a un polimorfismo genético para producir un agente de ARNi, agente que puede administrarse después al mamífero, y puede determinarse si una modificación en la característica se correlaciona con la inhibición.

El agente de ARNi de la presente invención es útil para permitir la inhibición de genes esenciales. Tales genes pueden ser necesarios para la viabilidad del organismo sólo en etapas del desarrollo o compartimentos celulares en particular. El equivalente funcional de las mutaciones condicionales puede producirse inhibiendo la actividad del gen objetivo cuando o donde no es necesario para la viabilidad. La invención permite la adición de un agente de ARNi en momentos del desarrollo y lugares del organismo específicos sin introducir mutaciones permanentes en el genoma objetivo.

En situaciones donde el ajuste alternativo produce una familia de transcritos que se distinguen por el uso de exones característicos, el agente de ARNi de la presente invención puede dirigirse a la inhibición a través de exones apropiados para inhibir específicamente o para distinguir entre las funciones de los miembros de la familia. Por ejemplo, una hormona que contenía un dominio transmembrana con ajuste alternativo puede expresarse tanto unido a membrana como en forma secretada. En lugar de aislar una mutación finalizadora que termina la traducción antes del dominio transmembrana, las consecuencias funcionales de tener sólo hormona secretada pueden determinarse de acuerdo con la invención dirigiéndose al exón que contiene el dominio transmembrana y, de este modo, inhibiendo la expresión de la hormona unida a membrana.

Aplicaciones terapéuticas

Los agentes de ARNi descritos en el presente documento pueden usarse en una variedad de aplicaciones terapéuticas en las que se desea modular, p. ej., uno o más genes objetivo en todo un mamífero o en una parte de él, p. e., tejido, órgano, etc. En tales procedimientos, se administra una cantidad eficaz de un agente activo de

ARNi al mamífero huésped. Con cantidad eficaz se quiere decir una dosificación suficiente para modular la expresión del/de los gen(es) objetivo como se desee. Como se indica anteriormente, en muchas realizaciones de este tipo de aplicación, se emplean los procedimientos de referencia para reducir/inhibir la expresión de uno o más genes objetivo en el huésped con el fin de lograr un resultado terapéutico deseado.

- 5 En función de la naturaleza de la afección que se está tratando, el gen objetivo puede ser un gen derivado de la célula, un gen endógeno, un gen mutado patológicamente, p. ej., un gen que provoca cáncer, un transgén o un gen de un patógeno que está presente en la célula después de infectarla. En función del gen objetivo y la dosis de agente de ARNi administrado en particular, el procedimiento puede proporcionar pérdida de función parcial o total del gen objetivo. Dosis más bajas de material inyectado y tiempos más largos después de la administración del agente de ARNi pueden dar como resultado la inhibición en una fracción de células menor.

- 10 Los agentes de ARNi descritos en el presente documento pueden usarse en el tratamiento de una variedad de afecciones diferentes en las que se desea la modulación de la expresión de un gen objetivo en un huésped mamífero. Con tratamiento se quiere decir que se logra al menos una mejora de los síntomas asociados con la afección que aflige al huésped, donde la mejora se usa en un sentido amplio para referirse a al menos una reducción de la magnitud de un parámetro, p. ej., síntoma, asociado con la afección que se está tratando. Como tal, el tratamiento incluye también situaciones donde la afección patológica, o al menos los síntomas asociados con ella, se inhiben completamente, p. ej., se evita que ocurran o se detienen, p. ej., se terminan, de modo que el huésped deja de padecer la afección o al menos los síntomas que caracterizan la afección.

- 15 Pueden tratarse una variedad de huéspedes de acuerdo con la invención. En general, dichos huéspedes son "mamíferos" o "de mamífero", donde estos términos se usan ampliamente para describir organismos que están dentro de la clase *Mammalia*, incluidos los órdenes de carnívoros (p. ej., perros y gatos), roedores (p.ej., ratones, cobayas y ratas) y primates (p. ej., seres humanos, chimpancés y monos). En muchas realizaciones, los huéspedes serán seres humanos.

- 20 Los agentes ARNi descritos aquí no se limitan a la modulación de la expresión de cualquier tipo específico de objetivo o secuencia de nucleótidos. Las clases representativas de genes objetivo de interés incluyen, pero no se limitan a: genes del desarrollo (p. ej., moléculas de adhesión, inhibidores de ciclina cinasas, citocinas/linfocinas y sus receptores, factores de crecimiento/diferenciación y sus receptores, neurotransmisores y sus receptores); oncogenes (p. ej., ABLI, BCL1, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSFIR, ERBA, ERBB, EBRB2, ETS1, ETS1, ETV6, PARA, FOS, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS, PIM 1, PML, RET, SRC, TALI, TCL3 y YES); genes supresores de tumores (p. ej., APC, BRCA 1, BPCA2, MADH4, MCC, NF1, NF2, RB1, TP53 y WTI); y enzimas (p. ej., ACC sintasas y oxidasas, ACP desaturasas e hidrolasas, ADP-glucosa piroforilasas, ATPasas, alcohol deshidrogenasas, amilasas, amiloglucosidasas, catalasas, celulasas, chalcona sintasas, quitinasas, ciclooxigenasas, descarboxilasas, dextrinasas, polimerasas de ADN y ARN, galactosidasas, glucanasas, glucosa oxidasas, almidón sintasas unidas a gránulo, GTPasas, helicasas, hemielulasas, integrasas, inulinasas, invertasas, isomerasas, cinasas, lactases, lipasas, lipooxigenasas, lisozimas, nopalina sintasas, octopina sintasas, pectinesterasas, peroxidasas, fosfatasas, fosfolipasas, fosforilasas, fitasas, sintasas reguladoras del crecimiento de plantas, poligalacturonasas, proteinasas y peptidasas, pulanasas, recombinasas, transcriptasas inversas, RUBISCO, topoisomerasas y xilanasas); quimiocinas (p. ej. CXCR4, CCR5), el componente de ARN de la telomerasa, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el receptor de VEGF, factor nuclear kappa B de los factores de necrosis tumoral, factores de transcripción, moléculas de adhesión celular, factor de crecimiento insulinoide, miembros de la familia beta de factores de crecimiento de transformación, receptores de superficie celular, proteínas de unión a ARN (p. ej., ARN nucleolares pequeños, factores de transporte de ARN), factores de traducción, transcriptasa inversa de la telomerasa); etc.

Kits

- 45 También se proporcionan en el presente documento reactivos y sus kits para poner en práctica uno o varios de los procedimientos descritos anteriormente. Los reactivos y sus kits pueden variar considerablemente. Normalmente, los kits incluyen al menos un agente de ARNi como se describe anteriormente.

- 50 Además de los componentes anteriores, los kits incluirán también instrucciones para la puesta en práctica de los procedimientos de referencia. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits descritos en una variedad de formas, de las que una o más pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que pueden estar presentes estas instrucciones es como información impresa en un medio o soporte adecuado, p. ej., un papel o papeles en los que se imprime la información en el envase del kit, en un prospecto del envase, etc. Otro medio más sería un medio legible por ordenador, p. ej., disquete, CD, etc. en el que se ha grabado la información. Otro medio más que puede estar presente es una dirección de página web que puede usarse a través de internet para acceder a la información en una página eliminada. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

Administración hidrodinámica de ARN desnudo

También se describen aquí procedimientos y composiciones para la introducción *in vivo* de un ácido nucleico desnudo, p. ej., ácido ribonucleico, desoxirribonucleico o ácidos nucleicos modificados químicamente (incluidos,

pero sin limitarse a, morfolino, ácidos nucleicos peptídicos, metilfosfonato, fosforotioato o 2'-Ometil oligonucleótidos), en la célula objetivo de un organismo vascularizado, p. ej., un mamífero. Estos procedimientos de la invención de referencia se denominan convenientemente procedimientos "hidrodinámicos".

5 Una formulación acuosa de un ácido nucleico desnudo y un inhibidor de ARNasa se puede administrar en el sistema vascular del organismo. La formulación acuosa también puede incluir un ácido ribonucleico competidor, p. ej. un ácido ribonucleico no poliadenilado sin casquete. En otras realizaciones más, se realiza la coadministración de ADN capaz de transcribirse en la molécula de ARN con agentes moduladores candidatos sin un inhibidor de ARNasa o un ácido nucleico competidor, donde el agente modulador y el ADN pueden administrarse o no como una sola composición. Los procedimientos de referencia pueden usarse en una variedad de aplicaciones diferentes, incluidas
10 aplicaciones tanto de investigación como terapéuticas, y son particularmente adecuados para su uso en la administración *in vivo* de un ácido nucleico a una célula hepática, p. ej., para administración *in vivo* de ácidos nucleicos dirigida al hígado.

Para describir adicionalmente este aspecto, se describirán en primer lugar los procedimientos descritos además en el presente documento, seguidos por una descripción de aplicaciones representativas en las que pueden usarse los
15 procedimientos de referencia y kits para su uso en la puesta en práctica de los procedimientos de referencia.

Procedimientos

Como se resume anteriormente, el procedimiento descrito también en el presente documento proporciona la introducción *in vivo* de un ácido nucleico, p. ej. un ácido ribonucleico, en una célula objetivo presente en un organismo pluricelular vascularizado. Con introducción *in vivo* se quiere decir que, en los procedimientos de
20 referencia, la célula objetivo en la que se introduce el ácido nucleico es una que está presente en el organismo pluricelular, es decir, no es una célula que está separada, p. ej. extirpada, del organismo pluricelular. Como tal, los procedimientos son distintos de los protocolos de transferencia de ácido nucleico *in vitro*, en los que se introduce un ácido nucleico en una célula o células separadas del organismo pluricelular del que son originarias, p. ej., están en cultivo. En otras palabras, los procedimientos no son procedimientos de transferencia de ácidos nucleicos *in vitro*.

25 Con introducción de un ácido nucleico se quiere decir que el ácido nucleico, p. ej., ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) o un análogo no natural de ácido nucleico, se inserta en el citoplasma de la célula objetivo. En otras palabras, el ácido nucleico se traslada desde el exterior de la célula objetivo al interior de la célula objetivo a través de la membrana celular.

Con organismo pluricelular vascularizado se quiere decir un organismo pluricelular que incluye un sistema vascular.
30 Los organismos pluricelulares de interés incluyen plantas y animales, donde los animales son de especial interés, en particular animales vertebrados que tienen un sistema constituido por un sistema de venas y arterias a través del cual se hace fluir la sangre, p. ej., en respuesta al latido de un corazón. Los animales de interés pueden ser mamíferos. Los mamíferos de interés incluyen; roedores, p. ej., ratones, ratas; ganado, p. ej., cerdos, caballos, vacas, etc., animales domésticos, p. ej., perros, gatos; y primates., p. ej., seres humanos. El organismo pluricelular
35 puede ser un ser humano. Además, el organismo pluricelular puede ser un mamífero no mamífero, p. ej., un roedor, tal como un ratón, una rata, etc.

Como se menciona anteriormente, los procedimientos, en el sentido más amplio, son adecuados para la introducción de ácidos nucleicos en la célula objetivo de un huésped. El término "ácido nucleico" como se usa en el presente documento significa un polímero compuesto por nucleótidos, p. ej. desoxirribonucleótidos o
40 ribonucleótidos, o compuestos producidos sintéticamente (p. ej. APN como se describe en la patente de EE. UU. N.º 5.948.902 y las referencias citadas en ella) que pueden hibridar con ácidos nucleicos naturales de una forma específica de secuencia análoga a la de dos ácidos nucleicos naturales. Los términos "ácido ribonucleico" y "ARN" como se usan en el presente documento significan un polímero compuesto por ribonucleótidos. Los términos "ácido desoxirribonucleico" y "ADN" como se usan en el presente documento significan un polímero compuesto por
45 desoxirribonucleótidos.

Los procedimientos son particularmente adecuados para su uso en la administración de un ácido ribonucleico en una célula objetivo de un organismo pluricelular. Como tal, los procedimientos se describirán ahora con mayor detalle en términos de la administración de ácidos ribonucleicos. Sin embargo, los siguientes protocolos también son adecuados para su uso en la administración de otros ácidos nucleicos, p. ej. ADN (tal como ADN plasmídico), etc.

50 En la puesta en práctica de los procedimientos, una composición acuosa del ácido ribonucleico en la que el ácido ribonucleico está presente como un ácido ribonucleico desnudo se administra al sistema vascular del organismo pluricelular o huésped. La formulación o composición acuosa de ARN desnudo se administra a la vena del huésped, es decir, la formulación de ARN desnudo se administra por vía intravenosa. La formulación de ARN desnudo se puede administrar por vía intravenosa al huésped a través de una inyección de alta presión. Con Inyección de alta
55 presión se quiere decir que la formulación acuosa se introduce por vía intravenosa a una presión elevada, donde, en general, la presión elevada es de al menos aproximadamente 20, habitualmente de al menos aproximadamente 30 mm de Hg. La presión elevada puede variar desde aproximadamente 10 hasta 50 mm de Hg, donde frecuentemente se prefiere de 40 a 50 mm de Hg. En las referencias enumeradas en la sección de literatura pertinente (*supra*) se

describen procedimientos de administración de formulaciones acuosas bajo alta presión, tales como las descritas anteriormente.

Como se menciona anteriormente, el ARN o ADN que se quiere introducir en la célula objetivo a través de los procedimientos descritos en el presente documento está presente en la formulación acuosa como ARN desnudo. Con "desnudo" se quiere decir que el ARN no tiene ningún vehículo de administración que pueda actuar facilitando la entrada en la célula objetivo. Por ejemplo, los ARN o ADN desnudos administrados en los procedimientos no tienen ningún material que promueva la transfección, tal como formulaciones liposómicas, lípidos cargados o agentes de precipitación, p. ej., no están complejados con materiales coloidales (incluidas preparaciones liposómicas). Además, los ARN desnudos no están contenidos en un vector que produciría la integración del ARN en el genoma de la célula objetivo, es decir, no tienen partículas o secuencias víricas que lleven información genética.

Los ARN desnudos que pueden administrarse mediante la presente invención puede variar ampliamente de longitud, en función del propósito al que se destinen, p. ej. la proteína que codifican, etc. En general, los ARN desnudos tendrán al menos aproximadamente 10 nt de largo, normalmente al menos aproximadamente 30 nt de largo y más habitualmente al menos aproximadamente 35 nt de largo, donde los ARN desnudos pueden tener hasta 20.000 nt de largo o más, pero en general no excederán de aproximadamente 10.000 nt de largo y habitualmente no excederán de 6.000 nt de largo. Donde el ARN desnudo es un agente de ARNi, como se describe anteriormente, la longitud del ARN varía desde aproximadamente 10 hasta 50 nt, frecuentemente desde aproximadamente 10 hasta 40 nt y más frecuentemente desde aproximadamente 15 hasta 30 nt, incluido de 15 a 25 nt, tal como de 20 a 25 nt, p. ej., 21 o 22 nt.

Los ARN desnudos que pueden introducirse en una célula objetivo de acuerdo con los procedimientos de referencia pueden o no codificar una proteína, es decir, que pueden o no ser capaces de traducirse en una proteína después de la introducción en la célula objetivo. Donde el ARN desnudo es capaz de traducirse en una proteína después de la introducción en la célula objetivo, el ARN desnudo puede o no tener casquete, puede incluir un dominio IRES, etc. Sin embargo, en muchos protocolos, el ARN desnudo tiene casquete. Además, el ARN, en general, incluye al menos una señal de poliadenilación y, está poliadenilado, donde la longitud de la cola de poliA, cuando está presente, varía generalmente desde aproximadamente 10 hasta 300, habitualmente desde aproximadamente 30 hasta 50. A continuación se proporciona una descripción adicional de los ARN desnudos.

Como se menciona anteriormente, se administra al huésped una formulación acuosa del ARN desnudo por vía intravascular, habitualmente por vía intravenosa. En las formulaciones acuosas empleadas en los procedimientos a, se combina una cantidad eficaz del ARN desnudo con un vehículo de administración acuoso. Con cantidad eficaz se quiere decir una cantidad que es suficiente para permitir la cantidad deseada de transferencia en la célula objetivo, p. ej., para proporcionar el resultado deseado, tal como la cantidad deseada de expresión de proteínas. La cantidad de ARN desnudo presente en la formulación acuosa es de al menos aproximadamente 5 microgramos, habitualmente de al menos aproximadamente 10 microgramos y más habitualmente de al menos aproximadamente 20 microgramos, donde la cantidad puede ser de hasta 10 miligramos o mayor, pero en general no excede de aproximadamente 1 miligramo y habitualmente no excede de aproximadamente 200 microgramos.

Los vehículos de administración acuosos de interés incluyen: agua, solución salina y medios tamponados. Los vehículos específicos de interés incluyen: solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, cloruro de sodio y dextrosa, solución de Ringer con lactato, solución salina tamponada con fosfato, etc. Los vehículos de administración acuosos pueden incluir además conservantes y otros aditivos, p. ej., antibióticos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes, regeneradores de nutrientes, regeneradores de electrolitos, cationes divalentes, tales como magnesio, calcio y manganeso, etc. Es de particular interés el uso de soluciones salinas tamponadas que son pseudofisiológicas.

Una característica de ciertos procedimientos descritos en el presente documento es que el ARN desnudo se introduce en el sistema vascular del organismo pluricelular en combinación con un inhibidor de ARNasa. Con inhibidor de ARNasa se quiere decir un compuesto o agente que al menos reduce la actividad de, si inactiva completamente, una actividad ARNasa en el organismo pluricelular. El inhibidor de ARNasa puede ser un inhibidor proteico de ARNasa, donde el inhibidor de ARNasa placentaria humana es de particular interés. El inhibidor de ARNasa proteico puede purificarse a partir de una fuente natural o producida artificialmente, p. ej. mediante técnicas recombinantes. El inhibidor de ARNasa placentaria humana puede obtenerse a partir de una variedad de fuentes diferentes bajo una variedad de nombres comerciales diferentes, donde las fuentes representativas incluyen: Promega, Inc., Strategene, Inc., Fisher Scientific, Inc. y similares.

Aunque puede administrarse el inhibidor de ARNasa al huésped en una composición independiente de la composición acuosa de ARN desnudo, en muchas realizaciones el inhibidor de ARNasa está presente en la composición acuosa de ARN desnudo. La cantidad de inhibidor de ARNasa que está presente en la composición acuosa es suficiente para permitir la incorporación deseada de ARN desnudo. Cuando el inhibidor de ARNasa es un inhibidor proteico, la concentración del inhibidor en la composición acuosa que se introduce en el organismo pluricelular durante la puesta en práctica de los procedimientos de referencia puede variar desde aproximadamente 4 hasta 4.000 unidades, habitualmente desde aproximadamente 400 hasta 4.000 unidades y más habitualmente

desde aproximadamente 400 a 1.500 unidades.

El ARN desnudo y el inhibidor de ARNasa se puede administrar conjuntamente con un ARN competidor. Con un ARN competidor se quiere decir un ARN que es capaz de funcionar como inhibidor competitivo de la actividad ARNasa. El ARN competidor puede estar sin casquete y no está poliadenilado. Con que no tiene casquete se quiere decir que el ARN competidor carece de la estructura de casquete que se encuentra en el extremo 5' del ARN mensajero eucariota, es decir, carece de 7 metil G en 5'. La longitud del ARN competidor puede variar, pero en general es de al menos aproximadamente 70 nt, habitualmente de al menos aproximadamente 200 nt y más habitualmente de al menos aproximadamente 1.500 nt, donde la longitud puede ser de hasta 10.000 nt o mayor, pero en general no exceda de aproximadamente 3.500 nt y habitualmente no excede de aproximadamente 1.500 nt. La concentración de ARN competidor en la composición acuosa es suficiente para permitir la protección deseada del ARN desnudo (p. ej. por medio de la competición por la unión de la ARNasa) y, en muchas realizaciones varía desde aproximadamente 10 µg/ml hasta 10 mg/ml, habitualmente desde aproximadamente 20 hasta 200 µg/ml y más habitualmente desde aproximadamente 40 hasta 150 µg/ml.

Los procedimientos de referencia dan lugar a una transferencia altamente eficaz del ARN administrado al citoplasma de la(s) célula(s) objetivo. Los procedimientos de referencia son particularmente adecuados para transferir ARN al citoplasma de células hepáticas o del hígado y de células no parenquimales del hígado. Como tal, en, los procedimientos descritos también en el presente documentos procedimientos *in vivo* para lograr un nivel alto de transferencia de ácido nucleico, p. ej., ARN, a células hepáticas o tejido del hígado.

El ácido nucleico que se introduce en la célula objetivo por medio de los procedimientos tiene una vida corta una vez dentro de la célula objetivo. En función de la naturaleza en particular del ácido nucleico, la semivida del ácido nucleico después de la introducción por medio de los procedimientos de referencia varía en general desde aproximadamente 30 s hasta 10 días, habitualmente desde aproximadamente 1 min hasta 24 h y más habitualmente desde aproximadamente 5 min hasta 10 h. Como tal, cuando el ácido nucleico es un ARN que codifica una proteína de interés, la expresión de proteínas después la introducción por medio de los procedimientos de interés es transitoria, durando normalmente un periodo de tiempo que varía desde aproximadamente 1 min hasta 3 días, habitualmente desde aproximadamente 5 min hasta 24 h. Como tal, los procedimientos descritos también aquí son procedimientos para permitir la expresión transitoria de las proteínas a partir de un transgén, donde la expresión de proteínas es igual al tiempo de vida del ARN. No obstante, la proteína expresada puede tener una vida más larga, en función de la naturaleza de la proteína en particular.

30 Utilidad

Los procedimientos también aquí descritos pueden usarse en una variedad de aplicaciones en las que se desea la transferencia eficaz *in vivo* de un ácido nucleico desnudo en una célula objetivo. Las aplicaciones en las que pueden usarse los procedimientos incluyen aplicaciones tanto terapéuticas como de investigación. Las aplicaciones terapéuticas de interés incluyen aplicaciones de tratamiento génico, aplicaciones de vacunación y similares. Las aplicaciones de investigación de interés incluyen la producción de modelos animales para afecciones en particular, p. ej., infecciones víricas de ARN, observación de la expresión génica en fenotipos para elucidar la función génica, etc. Otras aplicaciones en las que pueden usarse los procedimientos descritos también en el presente documento incluyen el desarrollo de tratamientos antisentido, de ribozimas y quimeroplastia (es decir, la reparación de genes por medio de quimeras de ARN/ADN) (véanse, p. ej., Yoon et al., Proc Natl Acad Sci USA (1996) 93(5):2071-6; Cole-Strauss et al., Science (1996)273 (5280): 1386-9; y Zhu et al., Proc Natl Acad Sci USA (1999) 96(15):8768-73), así como tratamientos de ARN de interferencia (ARN cuya presencia en la célula evita la traducción de ARN similares (véanse, p. ej., Wianny et al., Nat Cell Biol (2000) 2(2):70-5; y SiQun et al., Nature (1998) 391: 806 - 811).

Un tipo de aplicación en el que pueden usarse los procedimientos también descritos aquí es en la síntesis de polipéptidos, p. ej. proteínas, de interés a partir de una célula objetivo, en particular la expresión transitoria de un polipéptido. En tales aplicaciones, se introduce un ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés en combinación con componentes de expresión necesarios y/o deseados, p. ej. estructuras de casquete en 5', dominios IRES, señales o colas de poliA, etc., en la célula objetivo mediante administración *in vivo* al organismo pluricelular en el que reside la célula objetivo, donde la célula objetivo funcionará como huésped de expresión para la expresión del polipéptido. Por ejemplo, cuando el ácido nucleico desnudo administrados por los procedimientos de referencia es ARN, el ARN es un ARN que es puede traducirse en el citoplasma de la célula objetivo dentro en la proteína codificada por la secuencia contenida en el ARN. El ARN puede o no tener casquete, donde cuando no tiene casquete incluye, en general, secuencia IRES. En general, el ARN también incluye además una cola de poliA, donde la longitud de la cola de poliA varía normalmente desde aproximadamente 10 hasta 300, habitualmente desde aproximadamente 30 hasta 50 nt. Después de la administración *in vivo* y la posterior introducción en la célula objetivo, el organismo pluricelular y la célula huésped objetivo presente en él, se mantiene después bajo condiciones suficientes para la expresión de la proteína codificada por el ARN transferido. Después, se recoge la proteína expresada y se purifica donde se desee, usando cualquier protocolo conveniente.

Como tal, los procedimientos descritos aquí proporcionan un medio para al menos amentar la cantidad de una proteína de interés en un organismo pluricelular. El término "al menos aumentar" incluye situaciones donde los procedimientos se emplean para incrementar la cantidad de una proteína en un organismo pluricelular donde está

presente una cantidad inicial de proteína determinada antes de poner en práctica los procedimientos. El término "al menos mejorar" también incluye aquellas situaciones en las que el organismo pluricelular no incluye sustancialmente nada de la proteína antes de la puesta en práctica de los procedimientos de referencia. Dado que los procedimientos pueden usarse para al menos aumentar la cantidad de una proteína presente en un organismo pluricelular, pueden usarse en una variedad de aplicaciones diferentes, incluidas aplicaciones de preparaciones farmacéuticas y aplicaciones terapéuticas, donde estas últimas se describe en mayor detalle a continuación.

Las aplicaciones terapéuticas en las que pueden usarse los procedimientos incluyen aplicaciones de tratamiento génico en las que los procedimientos de referencia se usan para aumentar la concentración de una proteína terapéutica en el organismo huésped, y aplicaciones de vacunación, en las que los procedimientos se usan para vacunar al huésped (o desarrollar vacunas para su administración mediante otros procedimientos). A diferencia de los protocolos de expresión a base de ADN, los protocolos de expresión a base de ARN de referencia no se complican con la necesidad de promotor, potenciador, represor y otros elementos reguladores asociados comúnmente con genes eucariotas. Los procedimientos pueden usarse para administrar una gran variedad de ácidos nucleicos terapéuticos que, tras entrar en la célula objetivo, permiten el aumento de la concentración de proteína requerido en la célula huésped. Los ácidos nucleicos terapéuticos de interés incluyen ácidos nucleicos que reemplazan los genes defectuosos en la célula huésped objetivo, tales como los responsables de estados de enfermedad basados en defectos genéticos, codificando productos que se supone que deben proporcionar estos genes defectuosos al huésped; ácidos nucleicos que tiene utilidad terapéutica en el tratamiento del cáncer; y similares. Los productos representativos implicados en estados de enfermedad por defectos génicos cuya concentración puede aumentarse poniendo en práctica los procedimientos incluyen, pero no se limitan a: factor VIII, factor IX, β -globina, receptores de proteínas de baja densidad, adenosina desaminasa, fosforilasa de nucleósidos de purina, esfingomielinasa, glucocerebrosidasa, regulador transmembrana de fibrosis quística, α -antitripsina, CD-18, ornitina transcarbamilasa, argininosuccinato sintetasa, fenilalanina hidroxilasa, α -cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, fumarilacetato hidrolasa, glucosa 6-fosfatasa, α -L-fucosidasa, β -glucuronidasa, α -L-iduronidasa, galactosa 1-fosfato uridiltransferasa y similares. Los ácidos nucleicos terapéuticos contra el cáncer que pueden administrarse por medios de los procedimientos incluyen: ácidos nucleicos que potencian la actividad antitumoral de los linfocitos codificando factores apropiados, ácidos nucleicos cuyo producto de expresión potencia la inmunogenicidad de las células tumorales, ácidos nucleicos que codifican supresores tumorales, ácidos nucleicos que codifican toxinas, ácidos nucleicos que codifican factores suicidas, ácidos nucleicos que codifican productos de resistencia a multifármaco, ribozimas, ribozimas de ADN, quimeras de ARN/ADN, ARN de interferencia y secuencias antisentido y similares.

Una característica importante de los procedimientos de referencia, como se describe anteriormente, es que los procedimientos de referencia pueden usarse para aplicaciones de tratamiento génico *in vivo*. Con aplicaciones de tratamiento génico *in vivo* se quiere decir que la célula o células objetivo en la que se desea la expresión del gen terapéutico no se extirpan del huésped antes de poner en práctica los procedimientos de referencia. Por el contrario, las composiciones de ácido nucleico desnudo se administran directamente al organismo pluricelular y las células objetivo las incorporan, después de lo cual se produce la expresión del producto codificado.

Como se menciona anteriormente, otra aplicación terapéutica en la que pueden usarse los procedimientos de referencia es en la vacunación de un huésped (así como el desarrollo de una vacuna para su administración mediante otros procedimientos). En estos procedimientos, el ácido nucleico desnudo, p. ej., ARN, que se administra huésped por medio de los procedimientos de referencia codifica un inmunógeno deseado que, después de la entrada del ARN en la célula objetivo, se expresa y se secreta para provocar la respuesta inmunitaria deseada. Los procedimientos de vacunación en los que se emplea el ácido nucleico desnudo y en los que pueden usarse los procedimientos de referencia de administración de ácido nucleico desnudo se describen con mayor detalle en el documento WO 90/11092, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia.

Como se menciona anteriormente, los procedimientos de referencia también pueden usarse en diversas aplicaciones de investigación. Una aplicación de investigación en la que puede usarse la invención de referencia es en la producción de modelos animales de infección por virus de ARN, donde los virus de ARN de interés incluyen: VHC, VIH, virus de la gripe A, hepatitis A, poliovirus, enterovirus, rinovirus, aftovirus y similares. Para producir tales modelos animales, en primer lugar se proporcionan construcciones que incluyen uno o más elementos reguladores de los virus de ARN de interés unidos de manera funcional a un dominio indicador, p. ej., un dominio que codifica un producto detectable (tal como la luciferasa, una proteína fluorescente, etc.); etc. De forma alternativa, pueden emplearse construcciones de ADN que pueden transcribirse *in vivo* en dichas construcciones de ARN. Estas construcciones se administran después a un huésped, p. ej., un ratón, de acuerdo con los procedimientos de referencia para producir un modelo animal de una infección por el correspondiente virus de ARN. Como tal, también se proporcionan los modelos animales de virus de ARN producidos por los procedimientos de referencia. En la sección experimental que figura a continuación se proporciona un protocolo representativo para la producción de un modelo animal de virus de ARN.

Los procedimientos también descritos aquí también pueden usarse en la administración de agentes terapéuticos de ARNi y/o de investigación, incluidos ARNsi y ARNsh, como se describe con mayor detalle anteriormente y en la sección experimental, a continuación.

También se proporcionan procedimientos de selección de agentes moduladores candidatos, p. ej., potenciadores o inhibidores, usando tales modelos animales. Pueden seleccionarse una variedad de tipos de agentes candidatos diferentes de acuerdo con los procedimientos. Los agentes candidatos engloban numerosas clases químicas, aunque normalmente son moléculas orgánicas, preferentemente compuestos orgánicos pequeños con un peso molecular de más de 50 y menos de aproximadamente 2.500 dalton. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructuras con proteínas, en particular enlaces de hidrógeno, e incluyen normalmente al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferentemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos comprenden frecuentemente estructuras cíclicas de carbono o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. También se encuentran agentes candidatos entre biomoléculas que incluyen péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, y sus derivados, análogos estructurales o combinaciones.

En el presente documento los ácidos nucleicos antisentido son de especial interés. El reactivo antisentido puede ser un oligonucleótidos antisentido (ODN), en particular ODN artificial con modificaciones químicas a partir de ácidos nucleicos nativos, o construcciones de ácido nucleico que expresan tales moléculas antisentido como ARN. La secuencia antisentido es complementario al ARNm del gen objetivo e inhibe la expresión de los productos del gen objetivo. Las moléculas antisentido inhiben la expresión génica por medio de diversos mecanismos, p. ej., reduciendo la cantidad de ARNm disponible para la traducción, a través de la activación de la ARNasa H o por impedimento estérico. Pueden administrarse una o una combinación de moléculas antisentido, donde una combinación puede comprender varias secuencias diferentes.

Las moléculas antisentido pueden producirse mediante la expresión de la totalidad o una parte de la secuencia del gen objetivo en un vector apropiado, donde el inicio transcripcional está orientado de tal forma que se produce una hebra antisentido como una molécula de ARN. De forma alternativa, la molécula antisentido es un oligonucleótido artificial. En general, los oligonucleótidos antisentido tendrán al menos aproximadamente 7, habitualmente al menos aproximadamente 12, más habitualmente al menos aproximadamente 16 nucleótidos de longitud, y no más de aproximadamente 500, habitualmente no más de aproximadamente 50, más habitualmente no más de aproximadamente 35 nucleótidos de longitud, donde la longitud se rige por la eficacia de la inhibición, especificidad, incluida la ausencia de reactividad cruzada, y similares. Se ha descubierto que los oligonucleótidos cortos, de desde 7 hasta 8 bases de longitud, pueden ser inhibidores fuertes y selectivos de la expresión génica (véase Wagner et al. (1996), Nature Biotechnol. 14:840-844).

Una región o regiones específica de la secuencia de ARNm de la hebra sentido endógena se escoge para que la complemente la secuencia antisentido. La selección de una secuencia específica para el oligonucleótido puede usar un método empírico, donde se ensayan varias secuencias candidatas para la inhibición de la expresión del gen objetivo en un modelo *in vitro* o animal. También puede usarse una combinación de secuencias, donde se seleccionan varias regiones de la secuencia de ARNm para complementación antisentido.

Los oligonucleótidos antisentido pueden sintetizarse químicamente mediante procedimientos conocidos en la técnica (véase Wagner *et al.* (1993), *supra*, y Milligan *et al.*, *supra*). Los oligonucleótidos preferidos se modifican químicamente a partir de la estructura de fosfodiéster nativa, con el fin de incrementar su estabilidad intracelular y afinidad de unión. Se han descrito una serie de modificaciones de ese tipo en la literatura, que alteran la química del esqueleto, los azúcares o las bases heterocíclicas.

Entre los cambios útiles en la química del esqueleto están los enlaces fosforodiamidato, metilfosfonatos fosforotioatos; fosforoditioatos, donde los dos oxígenos que no forman el puente se sustituyen con de azufre; fosforoamiditas; fosfotriésteres de alquilo y boranofosfatos. Los derivados fosfato aquirales incluyen 3'-O-5'-S-fosforotioato, 3'-S-5'-O-fosforotioato, 3'-CH₂-5'-O-fosfonato y 3'-NH-5'-O-fosforoamidato. Los ácidos nucleicos peptídicos reemplazan la totalidad del esqueleto de fosfodiéster de ribosa con un enlace peptídico. También se usan modificaciones de azúcar para potenciar la estabilidad y la afinidad. Un ejemplo es la sustitución del azúcar ribosa con una morfolina. Puede usarse el α -anómero de la desoxirribosa, donde la base está invertida con respecto al β -anómero natural. El 2'-OH del azúcar ribosa puede modificarse para formar 2'-O-metil o 2'-O-alil azúcares, lo que proporciona resistencia frente a la degradación sin afectar a la afinidad. La modificación de las bases heterocíclicas debe mantener el apareamiento de bases correcto. Algunas sustituciones útiles incluyen desoxiuridina por desoxitimidina; 5-metil-2'-desoxicidina y 5-bromo-2'-desoxicidina por desoxicidina. Se ha mostrado que la 5-propinil-2'-desoxiuridina y la 5-propinil-2'-desoxicidina incrementan la afinidad y la actividad biológica cuando se sustituyen por desoxitimidina y desoxicidina, respectivamente.

Los agentes candidatos se obtienen a partir de una amplia variedad de fuentes, incluidas colecciones de compuestos artificiales o naturales. Por ejemplo, se dispone de numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluida la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. De forma alternativa, se dispone o pueden producirse fácilmente colecciones de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. Adicionalmente, las colecciones y los compuestos naturales o producidos de forma artificial se modifican fácilmente por medios convencionales químicos, físicos y bioquímicos y pueden usarse para producir colecciones combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc. para producir análogos estructurales.

En tales ensayos de selección, la construcción de ácido nucleico (p. ej., la construcción de ARN o ADN descrita anteriormente) y el agente candidato se administran al animal huésped, se observa el efecto del agente candidato sobre la actividad de la construcción y el efecto observado se relaciona con la actividad moduladora del compuesto candidato. El agente candidato y la construcción de ácido nucleico pueden administrarse al huésped de acuerdo con los procedimientos de referencia al mismo tiempo o en momentos diferentes, donde en ciertas realizaciones preferidas los dos componentes se administran al huésped simultáneamente, p. ej., en forma de una única composición líquida. En la sección experimental que figura más adelante se proporcionan ensayos de selección representativos.

Otra aplicación de investigación en la que pueden usarse los procedimientos de referencia es la elucidación de la función génica. En tales procedimientos, se introduce el ARN con una secuencia génica en particular por medio de los procedimientos de referencia y se observa el efecto del gen sobre el fenotipo del organismo. Los beneficios de usar los procedimientos de referencia para aplicaciones de investigación de la función génica incluyen la capacidad de expresar los genes sin preocuparse por los elementos reguladores genéticos. Otras aplicaciones de investigación en las que pueden usarse los procedimientos de referencia incluyen, pero no se limitan a: el estudio de la eficacia de ribozima y antisentido; el estudio del metabolismo del ARN y similares.

Kits

En el presente documento también se proporcionan kits para su uso en la puesta en práctica de los procedimientos también descritos en el presente documento de administración de ácidos nucleicos *in vivo* a una célula objetivo, p. ej., células hepáticas. En general, los kits de referencia incluyen un ácido nucleico desnudo que se desea introducir en la célula objetivo y un inhibidor de ARNasa. Los kits pueden incluir además un vehículo acuoso de administración, p. ej., una solución salina tamponada, etc. Además, los kits pueden incluir un ARN competidor, como se describe anteriormente. En los kits, los componentes anteriores pueden combinarse en una sola composición acuosa para su administración al huésped o por separado como composiciones diferentes o independientes, p. ej. en recipientes separados. Opcionalmente, el kit puede incluir además un medio de administración vascular para administrar la composición acuosa al huésped, p. ej., una jeringuilla, etc., donde el medio de administración puede estar o no precargado con la composición acuosa. En casos en los que se transcribe el gen indicador *in vivo* a partir de un ADN, no son necesarios el inhibidor de ARNasa y el ARN competidor.

Además de los componentes anteriores, los kits también descritos aquí incluirán también instrucciones para la puesta en práctica de los procedimientos descritos aquí. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits en una variedad de formas, de las que una o más pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que pueden estar presentes estas instrucciones es como información impresa en un medio o soporte adecuado, p. ej., un papel o papeles en los que se imprime la información en el envase del kit, en un prospecto del envase, etc. Otro medio más sería un medio legible por ordenador, p. ej., disquete, CD, etc. en el que se ha grabado la información. Otro medio más que puede estar presente es una dirección de página web que puede usarse a través de internet para acceder a la información en una página eliminada. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Parte experimental

I. ARNi en mamíferos

A. Se coadministraron 2 microgramos de un plásmido que expresa un ARNm de luciferasa (pCMVGL3) mezclado con 1,8 ml de PBS, 1.200 unidades de ARNasina y 40 microgramos de ARN competidor junto con las formulaciones siguientes:

1) (Grupo 1 sin ARN) 1,8 ml de PBS como control no tratado;

2) (Grupo 2 ARN antisentido) 1,8 ml de PBS mezclado con 20 microgramos de quimera de ARN/ADN de 21 meros con orientación antisentido con la secuencia 5'--UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3' (SEQ ID NO: 01) (los residuos de desoxitimilato se indican mediante dT, el resto de nucleótidos son ribonucleótidos); o

3) (Grupo 3 ARNi) 1,8 ml de PBS mezclado con 20 microgramos del antisentido de 21 meros descrito anteriormente alineado con 20 microgramos de su complemento sentido (con secuencia 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3') (SEQ ID NO: 2).

Los oligonucleótidos se cinasaron usando adenosina trifosfato y la cinasa de polinucleótidos T4. Cada formulación (1-3) se probó mediante inyección a alta presión en la vena de la cola en ratones Balb/c hembra de 5 semanas de edad. 5, 72 y 96 horas después de la inyección, se midió la luz emitida como consecuencia de la expresión de la luciferasa como se describe anteriormente. Los resultados de este experimento se resumen en la tabla que aparece a continuación. Los números se expresan como unidades lumínicas relativas.

	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 3
		error estándar		error estándar		error estándar
	sin ARN		Antisentido		ARNi	
3 horas	1,11x10 ⁹	2,05x10 ⁸	1,29x10 ⁹	7,90x10 ⁷	7,90x10 ⁸	3,54x10 ⁷
72 horas	6,60x10 ⁶	7,57x10 ⁵	5,41x10 ⁶	9,91x10 ⁵	8,23x10 ⁵	2,88x10 ⁵
96 horas	3,41x10 ⁶	4,50x10 ⁵	2,72x10 ⁶	5,25x10 ⁵	4,61x10 ⁵	6,77 x 10 ⁶

Los resultados anteriores demuestran que el ARNi (grupo 3) provocó la destrucción del ARN de luciferasa en el hígado de un mamífero adulto. Esta destrucción dio lugar a una disminución de la luz emitida como consecuencia de la actividad luciferasa en comparación con animales que no recibieron ARN o que recibieron oligonucleótido antisentido solo. Por lo que respecta a los autores, esta es la primera demostración de que el ARNi es eficaz en un mamífero adulto. Este procedimiento proporciona un sistema modelo para estudiar el mecanismo por el que el ARNi funciona en un mamífero. También es útil para el desarrollo y la optimización de tratamiento a base de ARNi. Además, no es necesario coadministrar el plásmido de expresión con el agente modulador. También podría administrarse un agente modulador dirigido a un gen endógeno.

B. En este caso, se sometió a prueba la capacidad del ARNi para suprimir la expresión génica en mamíferos adultos. Se descubrió que los ARN de interferencia pequeños (ARNsi) son inhibidores potentes de la expresión génica *in vivo*. Además, los ARN de horquilla pequeños (ARNsh) son de una eficacia similar. En particular, estos agentes de ARNi pueden administrarse como ARN artificiales o bien transcribirse *in vivo* a partir de construcciones de expresión de ADN. Estos estudios indican que el ARNi puede desarrollarse como herramienta terapéutica y demuestran que puede emplearse con estrategias de tratamiento génico convencionales.

1. ARNsi

Se modificaron procedimientos de transfección hidrodinámica existentes (J. Chang, L. J. Sigal, A. Lerro, J. Taylor, J Virol 75, 3469-73. (2001)) para permitir una administración eficaz de ARN desnudos. Se coinyectaron o un ARNsi derivado de luciferasa de luciérnaga o un ARNsi no relacionado con un plásmido de expresión de luciferasa (descripción de la construcción en la figura 1). La expresión de la luciferasa se monitorizó en animales vivos usando formación de imágenes de cuerpo entero cuantitativa después de la inyección de un sustrato de luciferasa (4) y fue dependiente de la cantidad de plásmido indicador inyectado y del tiempo posterior a la transfección (datos no mostrados). En la figura 2A se muestran animales representativos. La cuantificación de estos resultados se muestra en la figura 2B.

En cada experimento, la medida en suero de un plásmido coinjectado que codifica la α -1 antitripsina humana (hAAT) (S: R. Yant; et al., Nat Genet 25, 35-41. (2000)) sirvió como control interno para normalizar la eficacia de la transfección y monitorizar la inhibición traduccional no específica. Las concentraciones séricas de hAAT promedio a las 74 horas fueron similares en cada grupo de animales.

Los resultados obtenidos indican inhibición mediada por ARNsi específica de la expresión de la luciferasa en ratones adultos ($p < 0,0115$); los ARNsi no relacionados no tuvieron efecto ($p < 0,864$). En 11 experimentos independientes, los ARNsi de luciferasa redujeron la expresión de la luciferasa (luz emitida) un promedio del 81 % (+/- 2,2 %).

2. ARNsh

Se sintetizaron ARN de horquilla cortos (ARNsh) dirigidos a luciferasa de luciérnaga o luciferasa de renilla mediante transcripción runoff *in vitro* con la polimerasa T7. La cotransfección de estos ARN transcritos *in vitro* con ADN de pGL3-Control dio lugar a una reducción de la expresión de luciferasa de luciérnaga en cultivo (Paddison et al., Genes Dev. 16(8):948-58 (2002)). Con el fin de probar si estos ARN de horquilla eran funcionales en ratones, se transfectaron hidrodinámicamente en ratones 40 μ g de ARNsh de luciferasa transcrito *in vitro* (o ARNsh de renilla como control), 2 μ g de ADN de pGL3-Control, 2 μ g de pThAAT, 800 unidades de ARNasina y 1,8 ml de PBS. La luz emitida por ratones 72 horas después de recibir los ARNsh de luciferasa de luciérnaga se redujo un promedio del 95 % (+/- 1,4 %) en comparación con el control no tratado. La luz emitida por ratones que recibieron el ARNsh de renilla se redujo sólo ligeramente. Sorprendentemente, la cotransfección del ADN molde de transcripción de la T7 con un plásmido que expresa la proteína polimerasa T7 no dio lugar a ninguna reducción en la actividad indicadora de la luciferasa en cultivo o en ratones (datos no mostrados).

Secuencia del ARNsh de luciferasa de luciérnaga (de 5' a 3')

**GGUCGAAGUACUCAGCGUAAGUGAUGUCCACUUAAGUGGGUGUUGUUU
GUGUUGGGUGUUUUGGUU (SEQ ID NO: 11)**

Secuencia del ARNsh de luciferasa de renilla (de 5' a 3')

**GGGAUGGACGAUGGCCUUGAUCUUGUUUACCGUCACACCCACCACUGG
5 GAGAUACAAGAUCAAGGCCAUCGUCUCCU (SEQ ID NO: 12)**

Los resultados anteriores demuestran que las horquillas cortas transcritas *in vitro* también redujeron la expresión de la luciferasa *in vivo*.

3. Conclusión

Los datos anteriores demuestran que el ARNi puede regular por disminución la expresión génica en ratones adultos.

10 C. El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus de ARN que infecta a 1 de 40 personas en todo el mundo y es la causa subyacente más común de trasplante de hígado en los países industrializados. Para determinar si el ARNi podía dirigirse contra un patógeno humano, se sometió a prueba la capacidad de varios ARNsi de dirigirse a ARN de VHC en hígado de ratón. Se usó una estrategia indicadora en la que se fusionaron secuencias de VHC con ARN de luciferasa y se monitorizó el ARNi por cotransfección *in vivo*. Los ARNsi dirigidos al sitio interno de entrada al ribosoma del VHC y la región codificante de la proteína del núcleo no consiguieron inhibir la expresión de la luciferasa. En contraste, los ARNsi dirigidos a la región NS5B de un ARN quimérico de fusión de proteína NS5B del VHC-luciferasa redujeron la expresión de la luciferasa en un 75 % (+/- 6,8 %). Estos resultados indican la utilidad de usar ARNi de forma terapéutica para dirigirse a patógenos humanos importantes.

15 D. A partir de estos datos, resulta evidente que los ARNsi son funcionales en ratones. Los ARNsh, que son igualmente eficaces en la inducción de la supresión génica, pueden expresarse *in vivo* a partir de molde de ADN usando promotores de la polimerasa de ARN III (Paddison et al., presentado). La expresión de un análogo de ARNsh (pShh1-Ff1) indujo hasta un 98 % (+/- 0,6 %) de supresión de la expresión de luciferasa, con una supresión promedio del 92,8 % (+/- 3,39 %) en tres experimentos independientes (figuras 2C y 2D). Un vector de expresión de ARNsh no tuvo ningún efecto (datos no mostrados). Además, la inversión de la orientación de la inserción de ARNsh (pShh1-Ff1rev) suprimió el silenciamiento, debido a una terminación alterada por la polimerasa de ARN III y la consecuente producción de un ARNsh con estructura incorrecta (Paddison et al., presentado). Estos datos indican que los ARNsh codificados por plásmidos pueden inducir una respuesta de ARNi potente y específica en ratones adultos. Además, demuestra que este procedimiento de administración de ARNi puede adaptarse para aprovechar el significativo progreso que se ha realizado en el desarrollo de vectores de transferencia génica.

20 Las estrategias de tratamiento génico existentes dependen en gran medida de la expresión ectópica de proteínas exógenas para lograr un resultado terapéutico. Desde su descubrimiento, el ARNi ha mantenido la promesa de complementar estos enfoques de ganancia de función proporcionando un medio para silenciar genes relacionados con enfermedades. Considerados en conjunto, los resultados obtenidos indican que puede inducirse ARNi en mamíferos adultos usando construcciones de ADN para dirigir la expresión de ARN de horquilla pequeños. Estos estudios demuestran que la presente invención proporciona sistemas de administración víricos y no víricos para la aplicación de ARNi terapéutico a una amplia variedad de enfermedades.

II. Administración hidrodinámica de ARN desnudo

A. Introducción

40 A menos que se indique lo contrario, en todos los experimentos los ARN y los ADN se añadieron a la cantidad indicada de ARNasina y se llevaron a un volumen final de PBS igual a 1,4-1,8 mililitros. Esta solución se inyectó en la vena de la cola de los ratones en 4-5 segundos. Todos los ARN usados en estos estudios se sintetizaron usando un kit mMessage Machine y se purificaron usando un kit RNeasy (ambos de Qiagen Inc.). Sin embargo, no debería ser necesario purificar el ARN y también deberían funcionar otros procedimientos de purificación existentes. La ARNasina usada en todos los experimentos enumerados en el presente documento fue ARNasina nativa purificada a partir de placenta humana, a no ser que se indique lo contrario (adquirida de Promega Inc.). Para las muestras de luciferasa, en el momento indicado, se administró a los ratones una inyección intraperitoneal de luciferina (1,5 microgramos/gramo de peso corporal) y se midió la luz emitida por el ratón. El fondo es de $\sim 2 \times 10^2$ unidades lumínicas relativas. Las muestras de factor IX humano se analizaron usando un inmunoensayo ligado a enzimas.

50 B. Administración hidrodinámica de ARN desnudo

Se inyectaron ARN que codificaban luciferasa en ratones vivos:

- 1) sin inhibidor de ARNasa o

2) con inhibidor de ARNasa (llamado ARNasina).

5 Todas las muestras de ARN contenían también un ARN no poliadenilado sin casquete (ARN competidor) se incluyó como inhibidor competitivo de la actividad ARNasa. El ARN total en cada muestra se ajustó hasta un total de 80 microgramos con ARN competidor. Como control negativo (descrito más adelante) también se inyectaron ADN que expresan la proteína luciferasa bajo el control de un promotor procariota. A las 3 y a las 6 horas se administró a los ratones una inyección intraperitoneal de luciferina (el sustrato de la enzima luciferasa) y se midió la luz emitida por el ratón.

Los resultados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1

Ácido nucleico usado	Número de ratones (N)	Formulación	Unidades lumínicas relativas (ULR/5 min)
ARN poliA	1	4 unidades de ARNasina	$1,0 \times 10^6$
ARN poliA	1	400 unidades de ARNasina	$2,0 \times 10^7$
ARN con señal de poliA	1	4 unidades de ARNasina	$7,2 \times 10^4$
ADN molde	1	Ninguna	señal de fondo

10

Los resultados anteriores muestran que:

- El ARN inyectado se transfecta al hígado de ratones vivos.
- El ARN poliadenilado con casquete con cola de poliA (ARN poliA) se traduce en hígados de ratón porque el ARN poliadenilado con casquete proporciona una señal de luciferasa intensa
- 15 ▪ El ARN con casquete con una señal de poliA (ARN con señal de poliA) se traduce en hígados de ratón pero proporciona una señal que es aproximadamente 100 veces menos intensa que la observada con el ARN que tiene una cola de poliA.

20 Los ARN usados en todos los experimentos aquí descritos se transcribieron a partir de un promotor bacteriano de un plásmido de ADN. Este promotor no debería funcionar de forma eficaz en células de mamíferos. El molde de ADN se eliminó después de la transcripción usando una ADNasa, aunque siempre cabe la preocupación de si la señal podría ser consecuencia de la contaminación por ADN. Para controlar esto, se inyectó una cantidad de ADN molde equivalente a la usada en la transcripción. Si la señal se debe a la contaminación por ADN, entonces esta muestra debería proporcionar una señal. Sin embargo, no se observa ninguna señal del control de ADN.

25 También se descubrió que la adición de un inhibidor de ARNasa (llamado ARNasina) protege al ARN de la degradación por nucleasas séricas, incrementando así la señal observada, debido a que la adición de la ARNasina incrementó la señal 20 veces a la dosis usada.

30 A partir de lo anterior, se deducen las siguientes conclusiones. La administración hidrodinámica de ARN desnudo da lugar a un nivel alto de transferencia de ARN a los hígados de ratones vivos. Además, el ARN con casquete y poliadenilado funciona mejor que el ARN con señal de poliadenilación pero sin cola de poliA, aunque ambos ARN proporcionaron una señal. La adición de un inhibidor de ARNasa protegió el ARN de la degradación, dando lugar a una señal de luciferasa alta. Finalmente, la señal observada con el ARN inyectado no se debe a la contaminación por ADN.

C. Perfeccionamiento del sistema

35 Se inyectaron ARN que codifican la proteína luciferasa en ratones vivos con 1) dosis altas o bajas de ARNasina nativa o recombinante o 2) después del tratamiento con ARNasa T1, que debería destruir el ARN y suprimir la señal (control negativo). Todas las muestras de ARN también contenían un ARN competidor sin casquete no poliadenilado, de modo que la cantidad total de ARN inyectado fue de 80 microgramos. También se inyectaron ADN de control que expresan la proteína luciferasa bajo el control de un promotor procariota en reacciones de control indicadas. A las 3 y a las 6 horas se administró a los ratones una inyección intraperitoneal de luciferina y se midió la luz emitida por el ratón. Este experimento es, en gran medida, para comprobar los resultados del primer experimento y para probar qué parámetros son importantes. En el punto temporal correspondiente a las seis horas, se sacrificó un ratón al que se le había inyectado ARN y se extirparon sus órganos para determinar qué órganos expresaban la luciferasa.

Los resultados se resumen en la tabla 2.

Tabla 2

Ácido nucleico usado	Microgramos de ARN o ADN	Número de ratones (N)	Formulación	Unidades lumínicas relativas (ULR/5 min) a las 3 horas	Unidades lumínicas relativas (ULR/5 min) a las 6 horas	Unidades lumínicas relativas (ULR/5 min) a las 24 horas
ARN poliA	35	1	240 unidades de ARNasina (nativa)	$1,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	Fondo
ARN poliA	50	1	240 unidades de ARNasina (nativa)	$1,6 \times 10^6$	$5,4 \times 10^5$	Fondo
ARN poliA	50	1	44 unidades de ARNasina (nativa)	$5,5 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	
ARN poliA	10	1	240 unidades de ARNasina (recombinante)	$7,7 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$	
ARN poliA	50	2	3.000 unidades de ARNasa T1	Fondo	Fondo	
ADN molde	2	1	Ninguna	Fondo	Fondo	

Los resultados anteriores demuestran que:

- 5
 - La dosis de ARNasina modifica el nivel de expresión observado porque el incremento de las dosis de ARNasina dió lugar a niveles incrementados de actividad luciferasa.
 - Tanto la ARNasina nativa como la recombinante protegen ambas al ARN.
 - Cuando el ARN se destruye con ARNasa, la señal se suprime, lo que demuestra que el ARN es responsable de la señal (control negativo).
- 10
 - Cuando se inyecta una cantidad de ADN molde equivalente a la usada en la transcripción sin tratamiento de ADNasa, no se observa ninguna señal, lo que demuestra que la señal no se debe a la contaminación por ADN.
 - El hígado es el único sitio de expresión de la luciferasa.

A partir de lo anterior, se deducen las siguientes conclusiones. La dosis de ARNasina afecta al nivel de expresión. Tanto la ARNasina nativa como la recombinante protegen al ARN inyectado. No se observó ninguna señal cuando se inyectó el ADN molde o cuando se destruyó el ARN con ARNasa, lo que demuestra que la señal no es consecuencia de la contaminación por ADN. Finalmente, el hígado es el único sitio de expresión de la luciferasa.

D. El ARN competidor potencia la actividad.

Se midió la actividad luciferasa de 20 microgramos de ARN de luciferasa con casquete y poliadenilado. Se sometieron a prueba cuatro condiciones en experimentos similares a los descritos en los experimentos 1 y 2:

- 20
 - 1) 400 unidades de ARNasina + ARN competidor;
 - 2) 40 unidades de ARNasina sin ARN competidor;
 - 3) 800 unidades de ARNasina sin ARN competidor;
 - 4) 1.200 unidades de ARNasina sin ARN competidor.

25 A las 3, a las 6 y a las 9 horas se administró a los ratones una inyección intraperitoneal de luciferina y se midió la luz emitida por el ratón.

Los resultados se resumen en la tabla 3.

Tabla 3

	Microgramos de ARN competidor	Unidades de ARNasina	Número de ratones (N)	Promedio (ULR/2 min) a las 3 horas	Promedio (ULR/2 min) a las 6 horas	Promedio (ULR/2 min) a las 9 horas
ULR	60	400	3	$7,6 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$
error estándar				$3,5 \times 10^4$	$4,2 \times 10^3$	$9,6 \times 10^2$
ULR	Nada	400	3.	$6,5 \times 10^3$	$4,2 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$
error estándar				$1,4 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$
ULR	Nada	800	3	$6,2 \times 10^4$	$8,7 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$
error estándar				$3,1 \times 10^4$	$2,5 \times 10^3$	$3,7 \times 10^2$
ULR	Nada	1200	3	$7,6 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$7,4 \times 10^3$
error estándar				$5,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$4,5 \times 10^3$

Los resultados anteriores demuestran que:

- 5
 - La dosis de ARNasina modifica la actividad luciferasa porque el incremento de las dosis de ARNasina dio lugar al incremento de la actividad luciferasa. La dosis más alta (1.200 unidades de ARNasina) proporcionó la mayor actividad en todos los tiempos probados.
 - La adición de ARN competidor potenció la actividad luciferasa medida, porque la presencia del ARN competidor potenció la actividad luciferasa. Este efecto fue sinérgico con el efecto protector de la ARNasina.
- 10 A partir de los resultados anteriores, se deducen las siguientes conclusiones. La adición de ARN competidor incrementa la señal de luciferasa. Además, el incremento de las dosis de ARNasina dio lugar al incremento de los niveles de la actividad luciferasa

E. Traducción independiente de casquete de la luciferasa usando un sitio interno de entrada al ribosoma.

- 15 En eucariotas, la traducción de ARN en proteínas se produce mediante dos mecanismos diferentes denominados traducción dependiente de casquete e independiente de casquete. La traducción independiente de casquete requiere una región no traducida en 5' llamada sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Varios virus de ARN, tales como el virus de la hepatitis C (VHC), el virus de la poliomielitis y la hepatitis A utilizan secuencias IRES para llevar a cabo la traducción independiente e casquete. Originalmente, se desarrolló el procedimiento de transfección de ARN aquí descrito con la idea de que pudiera usarse para preparar un sistema de modelo de animal pequeño
- 20 para estudiar tratamientos contra el VHC. La transfección con ARN con IRES también podría usarse para estudios de mutagénesis diseñados para analizar los elementos de secuencia necesarios para la función de IRES eficaz.

1. Descripción del experimento y los resultados:

- 25 El ARN de VHCluc tiene el IRES de VHC en el extremo 5' y el gen de la luciferasa seguido por una cola de poliA. Se inyectaron 40 microgramos de VHCluc + 40 microgramos de ARN competidor + 20 microlitros de ARNasina en la vena de la cola de los ratones. A las 3 y a las 6 horas se administró a los ratones una inyección intraperitoneal de luciferina y se midió la luz emitida por el ratón. Resultado: El IRES del VHC fue capaz de dirigir la traducción de la fusión de ARN de VHC y luciferasa. La cuantificación de los resultados se resume en la tabla 4. Tabla 4

	3 horas después de la inyección	6 horas después de la inyección
Unidades lumínicas relativas promedio	$1,7 \times 10^5$	$4,6 \times 10^4$
Error estándar	$7,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$

F. Pueden producirse y secretarse concentraciones séricas medibles de la proteína de factor IX humano (hFIX) tras la inyección de ARN de hFIX.

5 La proteína de factor IX humano es una proteína de coagulación sanguínea que no producen algunos pacientes con hemofilia. Las concentraciones séricas de esta proteína pueden medirse fácilmente usando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA). Se eligió expresar esta proteína por dos motivos:

1) El hFIX es una proteína terapéuticamente relevante. Aunque la expresión transitoria del hFIX no es clínicamente relevante, sería deseable expresar de forma transitoria otros tipos de proteínas terapéuticas que no requieren expresión crónica.

10 2) El hFIX es una proteína humana y, por tanto, puede provocar una respuesta inmunitaria en ratones.

Una aplicación de la inyección de ARN que el desarrollo y la prueba de vacunas. Una respuesta inmunitaria frente al hFIX tras la inyección de ARN de hFIX demostraría la prueba del principio del uso de ARN como vacuna.

1. Descripción del experimento y los resultados:

15 Se inyectaron 40 microgramos de ARN de hFIX con casquete y poliadenilado + 40 microgramos de ARN competidor + 800 unidades de ARNasina a través de la vena de la cola en 1 ratón. Resultado: Se detectaron 40 nanogramos/mililitro de suero mediante ELISA a las 6 horas. Esta cantidad de hFIX está dentro del intervalo significativo del ensayo ELISA.

G. Administración hidrodinámica de ARN genómicos de VHC para crear un modelo de ratón de VHC

Se inyectaron dos grupos de 6 ratones con:

20 1) 50 microgramos de ARN genómico de longitud completa de VHC con casquete llamado 90 FL VHC (que también contiene algo de ARN sin casquete) + 40 microgramos de ARN de hFIX con casquete y poliadenilado + 400 unidades de ARNasina; o

25 2) un ARN genómico de HVC no infeccioso de longitud completa que tiene una mutación en el gen de la replicasa que lo hace catalíticamente inactivo (llamado 101 FL VHC) + 40 microgramos de ARN de hFIX con casquete y poliadenilado + 400 unidades de ARNasina.

Los moldes de transcripción para preparar los ARN de VHC se obtuvieron de Charles Rice y la Universidad de Washington. Seis horas después de la inyección, se extrajo sangre de los ratones y se están midiendo las concentraciones de hFIX para normalizar la eficacia de la inyección. Se espera que los ARN de VHC inyectados se degraden rápidamente. Es probable que cualquier ARN detectado después de unos días sea un ARN de nueva síntesis durante la duplicación vírica. Se ha desarrollado un procedimiento de PCR cuantitativa en tiempo real para medir las concentraciones de ARN de VHC en los hígados de estos ratones. Si se produce la duplicación del virus, entonces las concentraciones de ARN de VHC en los ratones inyectados con 90 FL VHC serán mayores que las concentraciones en ratones inyectados con 101 FL VHC cuando se midan semanas después la inyección. También se está desarrollando un ensayo histológico con el fin de ensayar la síntesis de proteínas de VHC. Pueden darse tres resultados positivos diferentes 1) el ARN entra en el hígado, pero no se traduce y no se duplica 2) el ARN entra en el hígado y se traduce, pero no se duplica 3) el ARN entra en el hígado, se traduce y se duplica. Los tres resultados son sistemas de modelo útiles. Si se producen 1, 2 o 3, entonces este sistema podría usarse para probar ribozimas dirigidas contra ARN de VHC (véase el experimento 9 a continuación). Si se producen 2 o 3, entonces este sistema podría usarse para probar la traducción, duplicación e infección de inhibidores de VHC.

40 La inyección de este ARN no dio lugar a un ciclo de duplicación vírica para el VHC. Sin embargo, otro grupo ha usado un procedimiento similar para iniciar un ciclo de duplicación de la hepatitis delta. Véase Chang J, Sigal LJ, Lerro A, Taylor J., J Virol.75(7): 3469-73 (2001).

H. Escisión *in vivo* de ARN de VHC por ribozimas

45 Se han sintetizado químicamente ADNzimas dirigidas a IRES de HCV. Se inyectaron hidrodinámicamente estas ribozimas en ratones y se evaluó su capacidad para reducir las concentraciones de ARN de HCV inyectados en el hígado. Se coinyectaron cinco nanomoles de ADNzima dirigida al IRES con 20 µg de un ARN constituido por el IRES de VHC seguido por la secuencia codificante de la luciferasa de luciérnaga seguida por 30 adenosinas. La secuencia

de la ADNzima era 5'-GAGGTTTAGGAGGCTAGCTACAACGATCGTGCTCA-3' (SEQ ID NO: 013). Los ratones que recibieron la ADNzima en combinación con el ARN objetivo emitieron un 95 % menos de luz a las 6 horas que los ratones que recibieron el ARN objetivo solo. Conclusión: Se demostró que esta ADNzima puede inhibir la traducción a partir del IRES de HVC, probablemente mediante la escisión de la secuencia de ARN del IRES. También se probaron ribozimas artificiales usando una metodología análoga y se descubrió que no eran eficaces.

I. Este experimento es para estudiar la evolución temporal de la expresión de la luciferasa después de una sola inyección de ARN con casquete y poliadenilado. Si se cumple la siguiente condición, entonces podemos usar un ajuste exponencial decreciente de primer orden (descrito en la ecuación 1) de los datos para calcular la velocidad de degradación de la proteína expresada. Con el fin de ajustar estos datos a un decrecimiento exponencial de primer orden sencillo, la semivida del ARNm debe ser significativamente menor que la semivida de la proteína (al menos 5-10 veces menor). Si esta condición no se cumple, entonces puede usarse una relación matemática más compleja que tenga en cuenta la semivida del ARNm. Otra solución a este problema es disminuir la semivida del ARNm haciendo que no tenga casquete u omitiendo el ARN competidor.

Si se define la cantidad de proteína en un momento dado (o la señal de la proteína) como A, la cantidad de proteína (o señal) en el primer punto temporal como A₀, la constante de velocidad de decrecimiento como k y el tiempo después de la primera medida como t, la ecuación tendría la forma:

$$A=A_0 \exp^{-kt} \quad (\text{Ecuación 1})$$

1. Descripción del experimento:

Se inyectaron cuatro grupos de 6 ratones con 20 microgramos de ARN de luciferasa con casquete y poliadenilado + 60 microgramos de ARN competidor sin casquete + 800 unidades de ARNasina. A las 3, 6, 9 o 24 horas, se administró a los ratones una inyección intraperitoneal de luciferina (1,5 microgramos/gramo de peso corporal) y se midió la luz emitida por el ratón.

Los resultados se proporcionan en la tabla a continuación:

	Horas transcurridas	Unidades lumínicas	Estándar	Error estándar
1	3.000	530000.000	330000.000	150000.000
2	6.000	200000.000	88000.000	36000.000
3	9.000	110000.000	43000.000	18000.000
4	24.000	19000.000	11000.000	4400.000

Se representaron las unidades lumínicas relativas frente al tiempo y la curva obtenida se ajusta a la ecuación 1. Este análisis proporciona una evidente velocidad de degradación constante de 0,297 horas⁻¹.

El procedimiento más común para medir la semivida de una proteína es el siguiente. En un enfoque, la proteína se purifica y a veces se marca (por ejemplo, con yodo radioactivo). La proteína purificada se inyecta y, en diferentes momentos, se toman muestras del animal y la cantidad de proteína que queda en cualquier momento dado se representa frente al tiempo y la curva se ajusta a una ecuación tal como la ecuación 1. La ventaja de este procedimiento es que no requiere la síntesis o la purificación in vitro de la proteína.

J. Se construyeron ARN que contenían regiones reguladoras del ARN de VHC que controlan la traducción de una proteína llamada luciferasa (denominados en el presente documento ARN de VHC luc). También se construyeron plásmidos de expresión de ADN que expresan ARN similares una vez que entran en las células (denominados aquí ADN de VHC luc). Para los diagramas de estas construcciones, véase la figura 3.

Cuando se transfectan los ARN de VHC luc o los ADN de VHC luc en ratones, se dirigen al hígado y los ARN o de VHC luc o ADN transcritos a partir de los ADN de VHC luc se traducen en la proteína luciferasa. En diversos momentos se inyecta en los ratones el sustrato de la proteína luciferasa, la luciferina. La enzima luciferasa consume la luciferina y produce luz en el proceso. La cantidad de luz emitida por los ratones es proporcional a la cantidad de proteína luciferasa presente en el momento de la toma de muestras.

Se han sintetizado oligonucleótidos artificiales cortos de un tipo conocido como oligos morfolino. Se mezcló 1 nanomol de un oligo morfolino con 10 microgramos de ARN de VHC luc o 1 microgramo de ADN de VHC luc. El oligo morfolino lo preparó Gene Tools, LLC en Corvallis, Oregón y tiene la secuencia 5'-TCTTTGAGGTTTAGGATTCGTGCTC-3' (SEQ ID NO: 14). Esta mezcla se añade después a 1,8 mililitros de solución tamponadora y se inyecta bajo alta presión en la vena de la cola de ratones como se describe en la solicitud anterior de los autores. Como control, se inyectan en otros ratones mezclas que no contienen el inhibidor. En presencia de inhibidor, la luz emitida se reduce en más del 90 %. A partir de este descubrimiento, se concluye que la

traducción del ARN inyectado o la traducción del ARN producido a partir del ADN traducido se evita por el inhibidor mediante un mecanismo antisentido. En el caso del ARN inyectado sólo se puede seguir esta inhibición durante aproximadamente 24 horas, debido a la estabilidad limitada del ARN en las células. En el caso del ADN inyectado, se puede monitorizar la traducción durante aproximadamente 8 días. La inhibición de la traducción se prolongó durante todo el periodo de tiempo en el que se pudo medir la traducción en este sistema.

K.

Experimento A

Grupo de control: Se inyectan ARN que contienen IRES de VHC y una secuencia indicadora de luciferasa en ratones y brillan cuando este ARN se traduce en la proteína luciferasa

10 Grupo de prueba:

Inhibidor coinyectado con ARN. Ambos se dirigen a las mismas células. La inhibición de expresa como actividad (brillo) en comparación con el grupo de control.

Experimento B

15 Igual que el experimento A, excepto porque se inyecta ADN que codifica el ARN objetivo junto con el inhibidor. El ADN se dirige al núcleo de los hepatocitos de ratón y se transcribe para proporcionar al ARN objetivo. Este ARN se dirige al citoplasma de las células, donde interacciona con el Inhibidor.

Las construcciones empleadas en estos experimentos se proporcionan en la figura 4. Los resultados de estos experimentos con inhibidores antisentido y de ADNzima se proporcionan en las figuras 5A a 5F.

20 El protocolo de selección anterior en el que se coadministran el inhibidor y el ARN/ADN ofrece importantes ventajas en términos de permitir la separación de problemas de administración de fármacos de problemas de eficacia de fármacos.

25 Resulta evidente a partir de los resultados y en análisis anteriores que la invención de referencia proporciona una manera viable de usar agentes de ARNi en organismos mamíferos no embrionarios, donde los procedimientos y composiciones de referencia pueden emplearse para una variedad de aplicaciones teóricas y terapéuticas diferentes. Además, la invención de referencia proporciona un procedimiento mejorado para la transferencia de un ácido nucleico a una célula objetivo proporcionado por la invención de referencia. Específicamente, la invención de referencia proporciona un procedimiento in vivo de alta eficacia para la transferencia de ácido nucleico desnudo que no emplea vectores víricos y, por lo tanto, proporciona ventajas con respecto a otros procedimientos de la técnica anterior de transferencia de ácido nucleico. Como tal, la invención de referencia representa una contribución significativa a la técnica.

30 Todas las publicaciones y solicitudes de patente citadas en esta memoria descriptiva se incorporan en el presente documento por referencia como si se indicara específicamente e individualmente la incorporación por referencia de cada publicación o solicitud de patente individual. La cita de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debería interpretarse como una admisión de que la presente invención no está legitimada para anteceder a tal publicación en virtud de una invención anterior.

Listado de secuencias

- <110> La Junta de Síndicos de la Universidad Leland Stanford Junior
- 5 <120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA LA INHIBICIÓN MEDIADA POR ARNI DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN MAMÍFEROS
- <130> STAN-180WO
- <150> 60/307,411
- 10 <151> 2001-07-23
- <150> 60/360,664
- <151> 2002-02-27
- 15 <160> 14
- <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- <210> 1
- 20 <211> 21
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> oligonucleótido
- <400> 1
- ucgaaguacu cagcguaagu u 21
- 30 <210> 2
- <211> 21
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> oligonucleótido
- <400> 2
- cuuacgcuga guacuucgau u 21
- 40 <210> 3
- <211> 21
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
- <223> oligonucleótido
- <400> 3
- 50 cuuacgcuga guacuucgau u 21
- <210> 4
- <211> 21

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido

 <400> 4 21
 uugaaugcga cucaugaagc u 21

 10 <210> 5
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 5 21
 agcuucauaa ggcgcaugcu u 21
 20
 <210> 6
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 6 21
 30 uuucgaagua uuocgguac g 21

 <210> 7
 <211> 23
 <212> ARN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 7 23
 40 cugugagauc uacggagccu guu 23

 <210> 8
 <211> 23
 45 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 50
 <400> 8
 uugacacucu agaugccuog gac 23

ES 2 386 775 T3

<210> 9
<211> 33
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> oligonucleótido

<400> 9
10 **ggauuccaau ucagcgggag ccaccugaug aag** 33

<210> 10
<211> 36
<212> ARN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 10
20 **uaaccuaagg uugagucgcu cucggugggc uaguuc** 36

<210> 11
<211> 66
25 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido
30
<400> 11

ggucgaagua cucagcguaa gugaugucca cuuaaguggg uguuguuugu guuggguguu 60
uugguu 66

<210> 12
35 <211> 78
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> oligonucleótido

<400> 12

gggauggacg auggccuuga ucuuguuuac cgucacaccc accacuggga gauacaagau 60
caaggccauc gucuuccu 78

<210> 13
45 <211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 13

gaggtttagg aggctagcta caacgatcgt gctca 35

5

<210> 14

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 14

15 tctttgaggt ttaggattcg tgctc 25

REIVINDICACIONES

1. Un ARNsi o ARNsh desnudo o uno de sus moldes de transcripción para su uso en el tratamiento de una infección por VHC en un mamífero no embrionario, en el que el ARNsi o ARNsh tiene entre 15 y 30 nucleótidos de longitud y el gen de VHC objetivo es el NS5B.
- 5 2. El ARNsi o ARNsh o su molde de transcripción de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho ARNsi o ARNsh tiene de 21 a 22 nucleótidos de longitud.
3. El ARNsi o ARNsh o su molde de transcripción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha secuencia génica objetivo es un transcrito de NS5B.
- 10 4. El ARNsi o ARNsh o su molde de transcripción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho mamífero no embrionario es un adulto.
5. El ARNsi o ARNsh o su molde de transcripción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho mamífero no embrionario es joven.
6. El ARNsi o ARNsh o su molde de transcripción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho ARNsi o ARNsh ha de administrarse hidrodinámicamente a dicho mamífero no embrionario.
- 15 7. El ARNsi o ARNsh de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho ARNsi o ARNsh ha de administrarse junto con un inhibidor de ARNasa.
8. El ARNsi o ARNsh o su molde de transcripción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que ha de administrarse por vía intravenosa.
- 20 9. El ARNsi o ARNsh o su molde de transcripción de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho ARNsi o ARNsh desnudo o uno de sus moldes de transcripción se ha de administrar a una célula del hígado.

Figura 1:

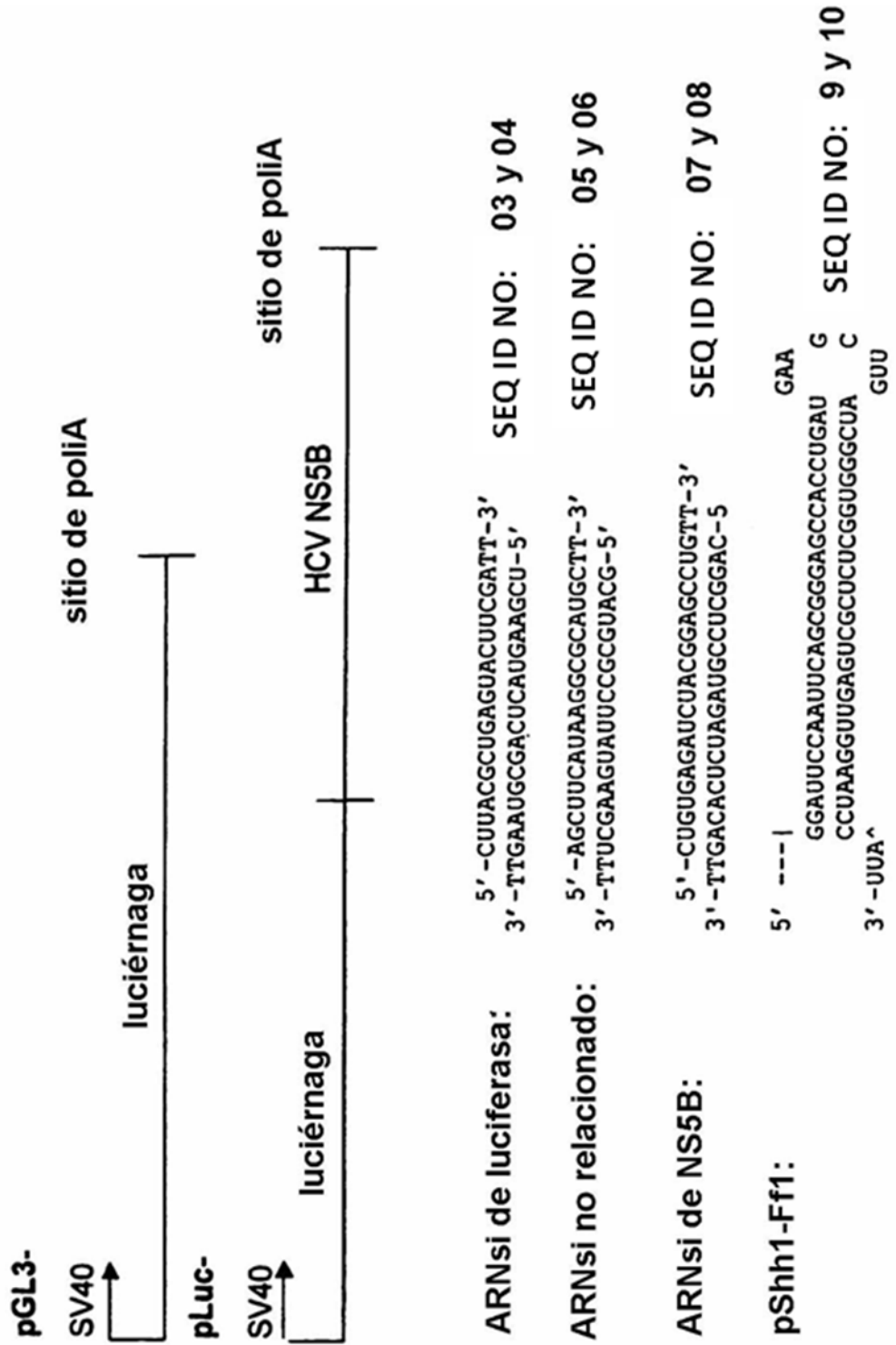
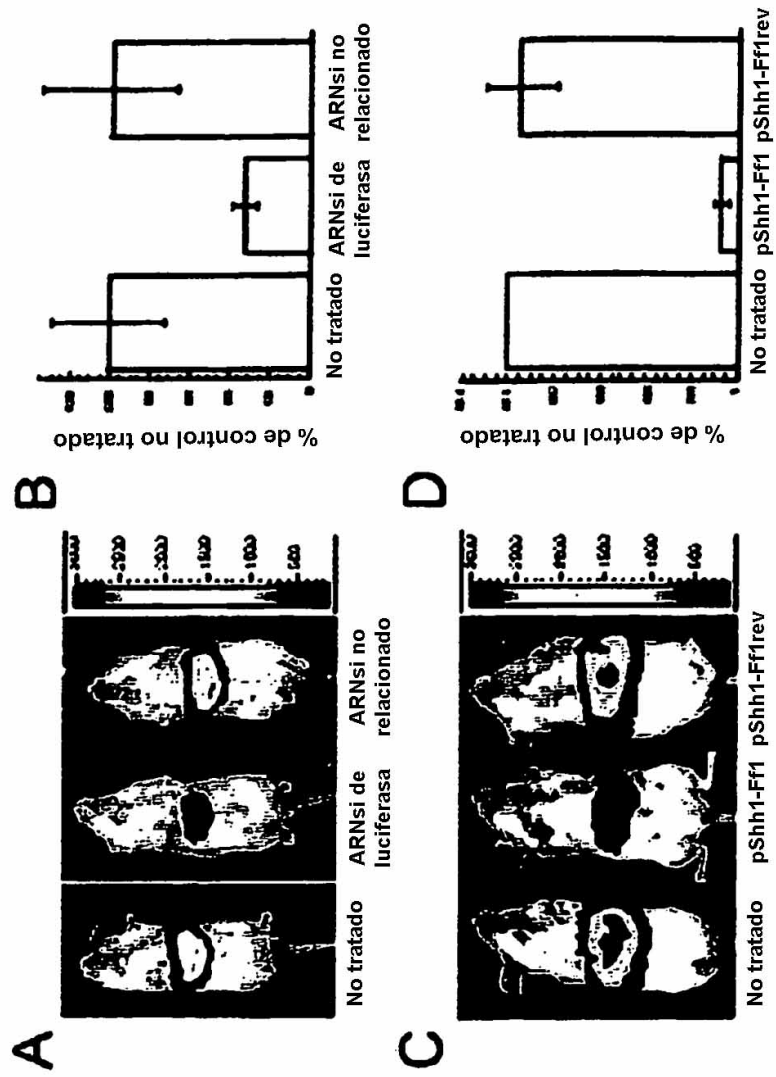


Figura 2



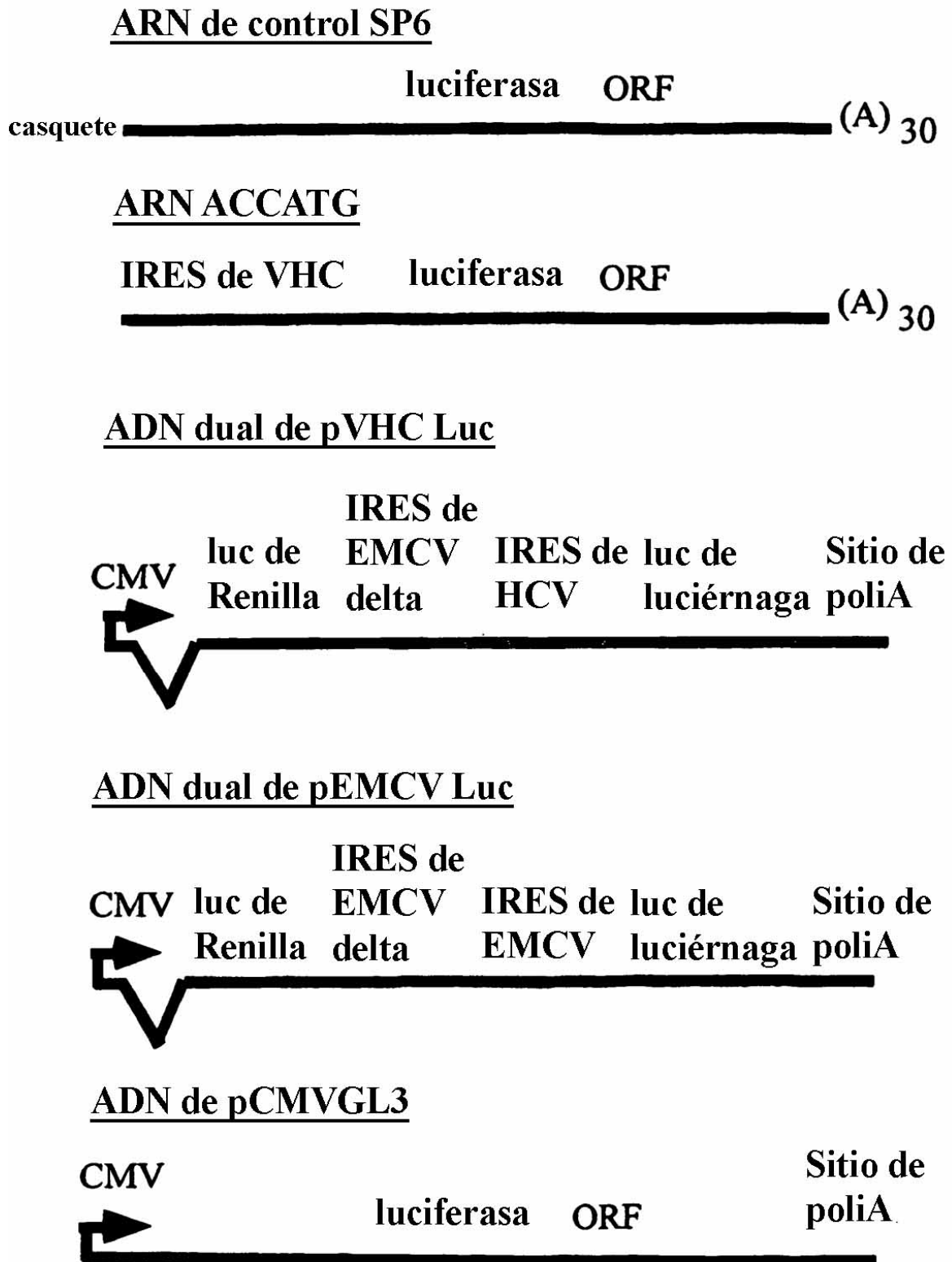


Figura 3



Figura 4

Figura 5A.
 El ARN de control SP6 no contiene un IRES de VHC y la traducción de este ARN no debería inhibirse por un morfolino antisentido. No lo hace. El ARN ACC no contiene un IRES y se inhibe su traducción.

Inhibición con morfolino de 25 meros de la traducción del ARN ACCATG

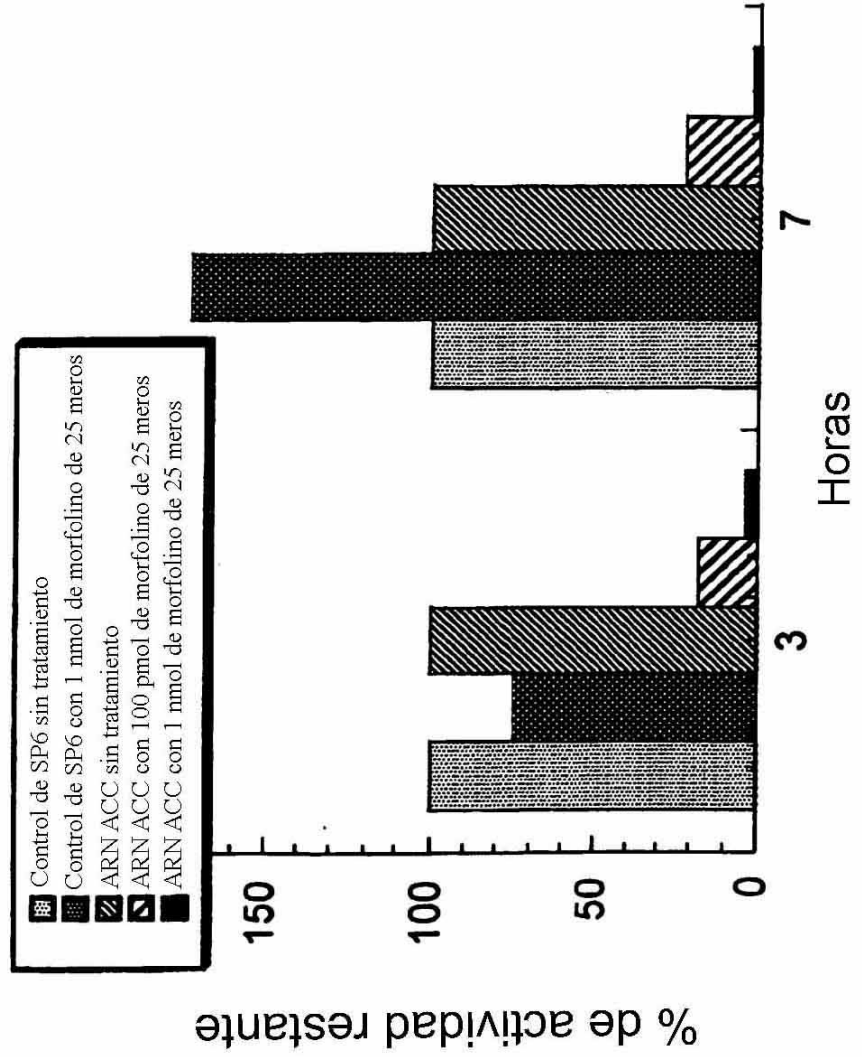


Figura 5B
 Las ADNzimas Dz 335 y Dz 352, así como la molécula antisentido Psdesoxi inhiben la traducción de ARN ACCATG (íguale a ARN ACC) uiéndose al IRES DE VHC

Inhibición de ARN ACCATG por Dz y PS desoxi antisentido

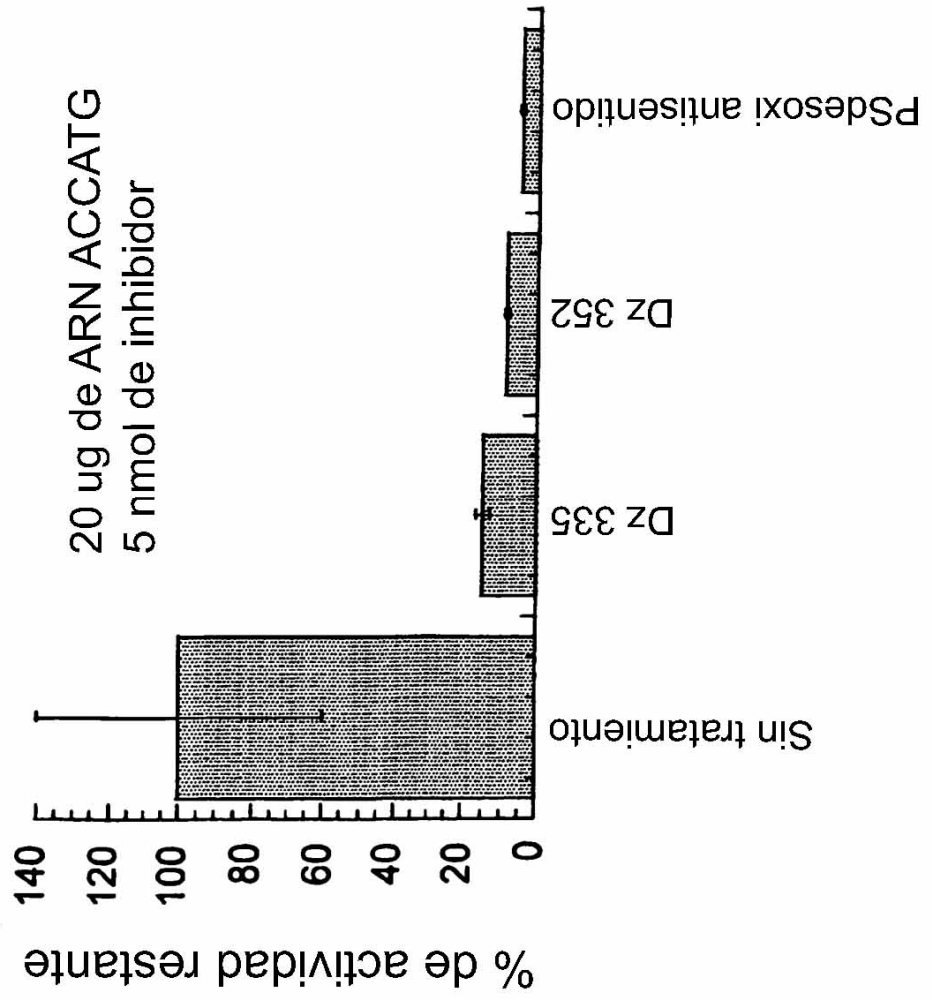


Figura 5C
 La molécula antisentido de morfolino de 25 meros inhibe la traducción de ARN ACCATG, que contiene el IRES de VCH, pero no el ARN de control SP6, que no lo tiene. Esta inhibición es dependiente de la dosis

Inhibición con morfolino de 25 meros de la traducción del ARN ACCATG

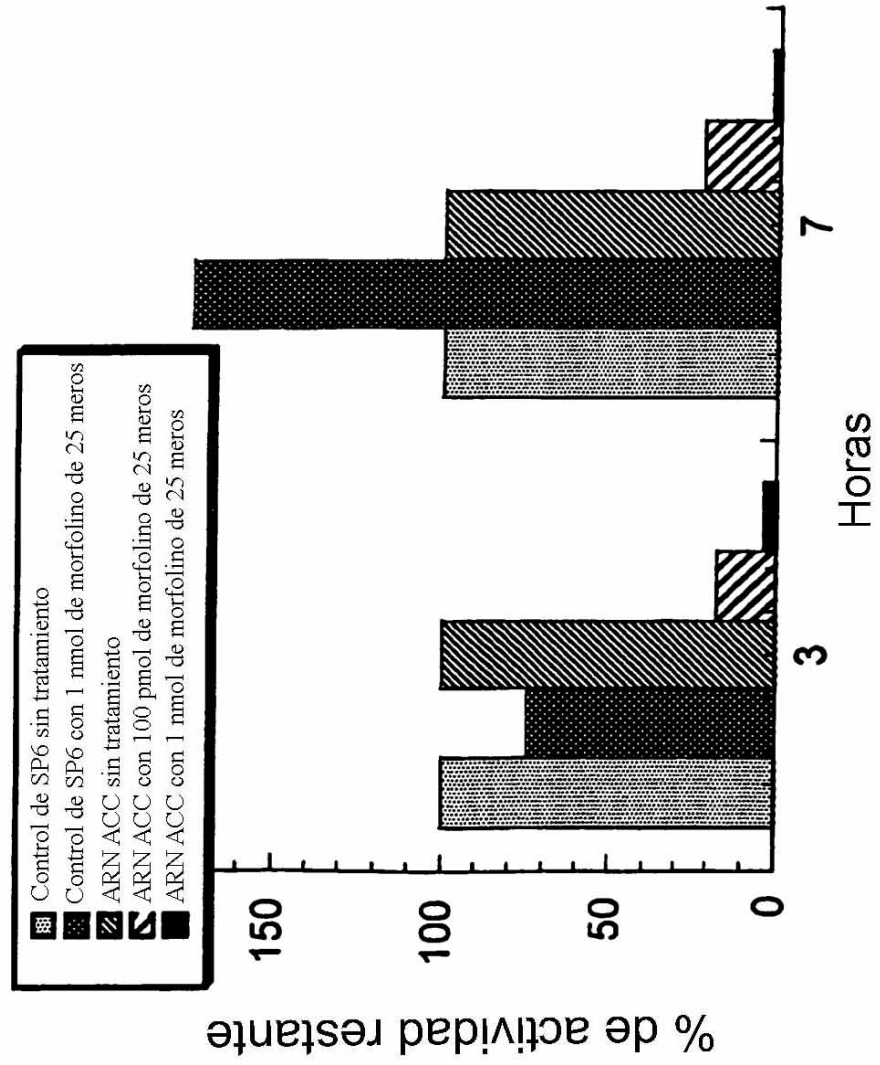


Figura 5D
 La molécula antisentido de morfolino de 25 meros inhibe la traducción de ARN que contiene IRES transcrito a partir de VHC dual luc. Sin embargo, esta inhibición no es específica, dado que un emparejamiento inadecuado de 4 bases también la inhibe. Un oligo más corto, morfolino de 20 meros, también inhibe y es específico, dado que el emparejamiento inadecuado de 4 bases no la inhibe.

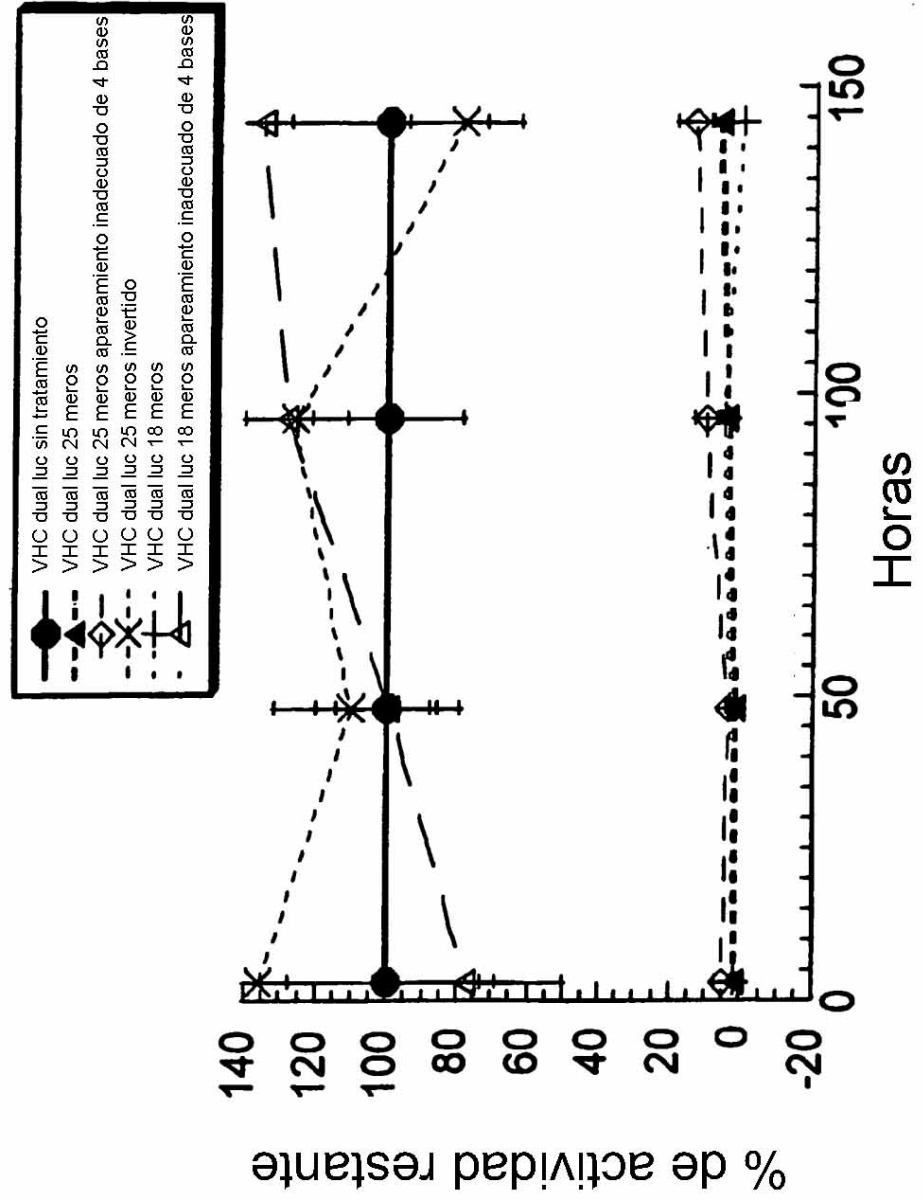


Figura 5E
 Los plásmidos EMCV dual luc y CMVGL3 no contienen un IRES de VHC y la traducción de la luciferasa no debería inhibirse por un morfino antisentido. No lo hace. Indicando de nuevo que la inhibición observada con ARN ACCATG y VHC dual luc es específica

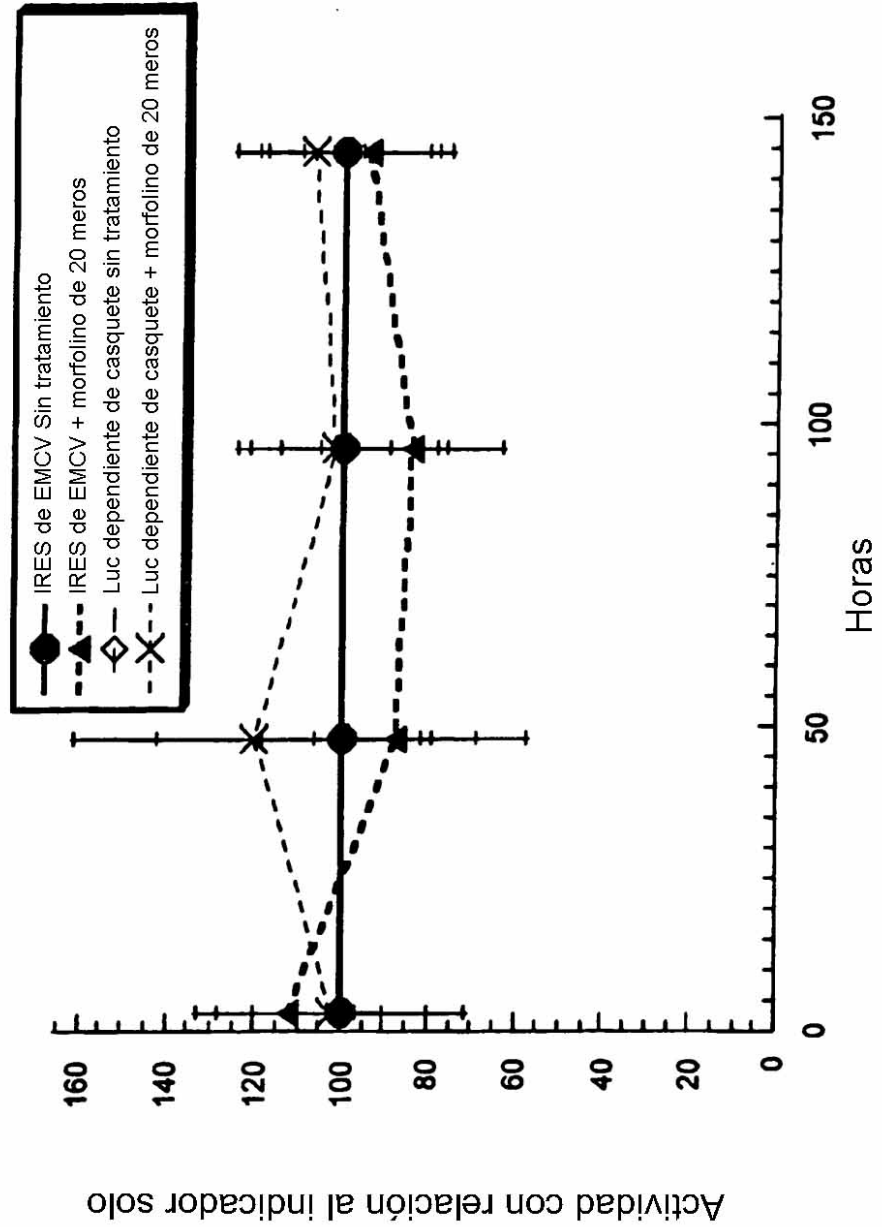


Figura 5F
 La inhibición de VHC dual luc por el morfolino de 20 meros es dependiente de la dosis entre 1 y 1000 picomoles por ratón, como es de esperar para un inhibidor antisentido

