

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 390**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2001 E 10179947 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2351852**

54 Título: **Interferencia de RNA mediadora de moléculas pequeñas de RNA**

30 Prioridad:

30.03.2001 US 279661 P
01.12.2000 EP 00126325

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.01.2014

73 Titular/es:

**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.**
(50.0%)
Hofgartenstrasse 8
80539 München, DE y
EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR
MOLEKULARBIOLOGIE (EMBL) (50.0%)

72 Inventor/es:

TUSCHL, THOMAS;
ELBASHIR, SAYDA;
LENDECKEL, WINFRIED;
WILM, MATTHIAS y
LÜHRMANN, REINHARD

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 437 390 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

Interferencia de RNA mediadora de moléculas pequeñas de RNA.

La presente invención se refiere a características de secuencia y estructurales de moléculas de (ds)RNA bicatenario requeridas para mediar modificaciones de ácido nucleico específicas de la diana tales como la interferencia de RNA y/o metilación del DNA.

La expresión "Interferencia de RNA" (RNAi) fue acuñada después del descubrimiento de que la inyección de dsRNA en el nematodo *C. elegans* conduce a silenciación específica de genes altamente homólogos en secuencia al dsRNA administrado (Fire et al., 1998). La RNAi fue observada también posteriormente en insectos, ranas (Oelgeschlaeger et al., 2000), y otros animales con inclusión de ratones (Svoboda et al., 2000; Wianny y Zernicka-Goetz, 2000) y es probable que exista también en humanos. La RNAi está estrechamente ligada al mecanismo de co-supresión postranscripcional para silenciación de genes (PTGS) en plantas y extinción en hongos (Catalanotto et al., 2000; Cogoni y Macino, 1999; Dalmay et al., 2000; Ketting y Plasterk, 2000; Mourrain et al., 2000; Smardon et al., 2000) y algunos componentes de la maquinaria de la RNAi son necesarios también para silenciación postranscripcional por co-supresión (Catalanotto et al., 2000; Dernburg et al., 2000; Ketting y Plasterk, 2000). El tópico ha sido revisado también recientemente (Bass, 2000; Boshier y Labouesse, 2000; Fire, 1999; Plasterk y Ketting, 2000; Sharp, 1999; Sijen y Kooter, 2000), véase también el ejemplar completo de *Plant Molecular Biology*, vol. 43, número 2/3, (2000).

En las plantas, además de PTGS, los transgenes introducidos pueden conducir también a silenciación transcripcional de genes por metilación del DNA dirigida por RNA de citosinas (véanse referencias en Wassenegger, 2000). Dianas genómicas tan cortas como 30 pb están metiladas en plantas de manera dirigida por RNA (Pelissier, 2000). La metilación del DNA está presente también en mamíferos.

La función natural de RNAi y la co-supresión parece ser la protección del genoma contra la invasión por elementos genéticos móviles tales como retrotransposones y virus que producen RNA o dsRNA aberrante en la célula hospedadora cuando se vuelven activos (Jensen et al., 1999; Ketting et al., 1999; Ratcliff et al., 1999; Tabara et al., 1999). La degradación específica del mRNA evita la replicación de transposones y virus, aunque algunos virus son capaces de contrarrestar o evitar este proceso por expresión de proteínas que suprimen la PTGS (Lucy et al., 2000; Voinnet et al., 2000).

El dsRNA desencadena la degradación específica de RNAs homólogos únicamente dentro de la región de identidad con el dsRNA (Zamore et al., 2000). El dsRNA se procesa a fragmentos de RNA de 21-23 nt y los sitios de escisión del RNA diana están distanciados regularmente con una separación de 21-23 nt. Por esta razón se ha sugerido que los fragmentos de 21-23 nt son los RNAs guía para reconocimiento de la diana (Zamore et al., 2000). Estos RNAs cortos fueron detectados también en extractos preparados a partir de células Schneider 2 de *D. melanogaster* que se transfectaron con dsRNA antes de la lisis celular (Hammond et al., 2000); sin embargo, las fracciones que exhibían actividad de nucleasa específica de la secuencia contenían también una gran fracción de dsRNA residual. El papel de los fragmentos de 21-23 nt en el guiado de la escisión de mRNA se ve respaldado adicionalmente por la observación de que fragmentos de 21-23 nt aislados de dsRNA procesado son capaces, en cierto grado, de mediar la degradación específica de mRNA (Zamore et al., 2000). Moléculas de RNA de tamaño similar se acumulan también en tejido vegetal que exhibe PTGS (Hamilton y Baulcombe, 1999).

En este caso, los inventores utilizan el sistema establecido de *Drosophila* in vitro (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000) para explorar adicionalmente el mecanismo de la RNAi. Se demuestra que RNAs cortos de 21 y 22 nt, cuando están apareados en bases con extremos 3' colgantes, actúan como los RNAs guía para degradación del mRNA específica de la secuencia. Los dsRNAs cortos de 30 pb son incapaces de mediar la RNAi en este sistema debido a que ya no se procesan a RNAs de 21 y 22 nt. Adicionalmente, se definieron los sitios de escisión de RNA diana con relación a los RNAs de interferencia cortos de 21 y 22 nt (siRNAs) y aportan evidencia de que la dirección de procesamiento del dsRNA determina si un RNA diana sentido o antisentido puede ser escindido por el complejo siRNA-endonucleasa producido. Adicionalmente, los siRNAs pueden ser también instrumentos importantes para modulación de la transcripción, v.g. silenciación de genes de mamífero por guiado de la metilación del DNA.

Experimentos adicionales en sistemas de cultivo de células humanas in vivo (células HeLa) demuestran que moléculas de RNA bicatenario que tienen preferiblemente una longitud de 19-25 nucleótidos tienen actividad de RNAi. Así, en contraste con los resultados de *Drosophila*, también moléculas de RNA bicatenario de 24 y 25 nt de longitud son eficientes para la RNAi.

WO 00/44895 da a conocer el uso médico de dsRNA.

El objeto subyacente de la presente invención es proporcionar nuevos agentes capaces de mediar la Interferencia de RNA específica de la diana u otras modificaciones de ácido nucleico específicas de la diana tales como metilación del DNA, teniendo dichos agentes eficacia y seguridad mejoradas comparados con agentes de la técnica anterior.

La solución de este problema se proporciona por una molécula de RNA bicatenario aislada en la forma de dos cadenas de RNA separadas, en donde cada cadena de RNA tiene una longitud de 19-23 nucleótidos, en donde

- dicha molécula de RNA es capaz de interferencia de RNA, en donde la molécula de RNA contiene al menos un análogo de nucleótido modificado, para uso en medicina. Preferiblemente, al menos una cadena tiene un colgante 3' de 1-3 nucleótidos y preferiblemente 2 nucleótidos. La otra cadena puede tener extremos romos o tiene un colgante 3' de hasta 6 nucleótidos. Asimismo, si ambas cadenas del dsRNA son exactamente de 21 ó 22 nt, es posible
- 5 observar cierta interferencia del RNA cuando ambos extremos son romos (colgante de 0 nt). La molécula de RNA es preferiblemente una molécula de RNA sintética que está sustancialmente exenta de contaminantes existentes en extracto de células, v.g. de embrión de *Drosophila*. Adicionalmente, la molécula de RNA está con preferencia sustancialmente exenta de cualesquiera contaminantes no específicos de la diana, particularmente moléculas de RNA no específicas de la diana, v.g., de contaminantes existentes en extractos de células.
- 10 Sorprendentemente, se encontró que moléculas de RNA bicatenario sintético corto, particularmente con extremos 3' colgantes son mediadores específicos de secuencia de RNAi y median la escisión eficiente del RNA diana, en donde el sitio de escisión está localizado cerca del centro de la región abarcada por el RNA guía corto.
- Preferiblemente, cada cadena de la molécula de RNA tiene una longitud de 20-22 nucleótidos (o 20-25 nucleótidos en células de mamífero), en donde la longitud de cada cadena puede ser igual o diferente. Con preferencia, la
- 15 longitud del colgante 3' alcanza de 1 a 3 nucleótidos, en donde la longitud del colgante puede ser igual o diferente para cada cadena. Las cadenas de RNA tienen preferiblemente grupos hidroxilo 3'. El término 5' comprende preferiblemente un grupo fosfato, difosfato, trifosfato o hidroxilo. Los dsRNAs más eficaces están compuestos de dos cadenas de 21 nt que están apareadas de tal modo que están presentes colgantes 3' de 1-3, particularmente 2 nt en ambos extremos del dsRNA.
- 20 La reacción de escisión del RNA diana guiada por siRNAs es altamente específica de la secuencia. Sin embargo, no todas las posiciones de un siRNA contribuyen por igual al reconocimiento de la diana. Los desapareamientos en el centro del dúplex de siRNA son sumamente críticos y anulan esencialmente la escisión del RNA diana. En contraste, el nucleótido 3' de la cadena de siRNA (v.g. la posición 21) que es complementario al RNA diana monocatenario, no contribuye a la especificidad del reconocimiento de la diana. Adicionalmente, la secuencia del colgante 3' de 2 nt no
- 25 apareado de la cadena de siRNA con la misma polaridad que el RNA diana no es crítica para la escisión del RNA diana, dado que sólo la cadena de siRNA antisentido guía el reconocimiento de la diana. Por tanto, a partir de los nucleótidos colgantes monocatenarios únicamente la posición penúltima del siRNA antisentido (v.g. posición 20) tiene que coincidir con el mRNA sentido direccionado.
- Sorprendentemente, las moléculas de RNA bicatenario de la presente invención exhiben una alta estabilidad in vivo
- 30 en suero o en medio de crecimiento para cultivos de células. Con objeto de mejorar adicionalmente la estabilidad, los colgantes 3' pueden estabilizarse contra la degradación, v.g., pueden seleccionarse de tal manera que estén constituidos por nucleótidos de purina, particularmente nucleótidos de adenosina o guanosina. Alternativamente, se tolera la sustitución de nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, v.g. sustitución de colgantes 3' uridina de 2 nt por 2'-desoxitimidina, y no afecta a la eficiencia de la interferencia de RNA. La ausencia de un hidroxilo 2'
- 35 mejora significativamente la resistencia a las nucleasas del colgante en medio de cultivo de tejidos.
- La molécula de RNA de acuerdo con la invención contiene al menos un análogo de nucleótido modificado. Los análogos de nucleótidos están localizados en posiciones en las cuales la actividad específica de la diana, v.g. la actividad mediadora de la RNAi no se ve afectada sustancialmente, v.g. en una región en el extremo 5' y/o el extremo 3' de la molécula de RNA bicatenario. Particularmente, los colgantes pueden estabilizarse por incorporación
- 40 de análogos de nucleótidos modificados.
- Los análogos de nucleótidos preferidos se seleccionan de ribonucleótidos modificados en el azúcar o la cadena principal. Sin embargo, debe observarse que también son adecuados ribonucleótidos modificados en la nucleobase, es decir ribonucleótidos que contienen una nucleobase no existente naturalmente en lugar de una nucleobase existente naturalmente tales como uridinas o citidinas modificadas en la posición 5, v.g. 5-(2-amino)propil-uridina, 5-
- 45 bromo-uridina; adenosinas y guanosinas modificadas en la posición 8, v.g. 8-bromo-guanosina; desaza-nucleótidos, v.g. 7-desaza-adenosina; nucleótidos O- y N-alquilados, v.g. N6-metil-adenosina. En ribonucleótidos preferidos modificados en el azúcar, el grupo 2-OH está reemplazado por un grupo seleccionado de H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ o CN, en donde R es C₁-C₆ alquilo, alqueno o alquínilo y halo es F, Cl, Br o I.
- En los ribonucleótidos preferidos modificados en la cadena principal, el grupo fosfoéster que conecta con los
- 50 ribonucleótidos adyacentes está reemplazado por un grupo unificado, v.g. de grupo fosfotioato. Debe observarse que las modificaciones anteriores pueden combinarse.
- La secuencia de la molécula de RNA bicatenario de la presente invención debe tener una identidad suficiente con una molécula diana de ácido nucleico a fin de mediar la RNAi específica de la diana y/o la metilación del DNA. Preferiblemente, la secuencia tiene una identidad de al menos 70% con la molécula diana deseada en la porción bicatenaria de la molécula de RNA. Más preferiblemente, la identidad es al menos 85% y muy preferiblemente 100%
- 55 en la porción bicatenaria de la molécula de RNA. La identidad de una molécula de RNA bicatenario con una molécula diana de ácido nucleico predeterminada, v.g. una molécula diana de mRNA puede determinarse como sigue:

$$I = \frac{n}{L} \times 100$$

en donde I es la identidad en porcentaje, n es el número de nucleótidos idénticos en la porción bicatenaria del dsRNA y la diana y L es la longitud del solapamiento de secuencias de la porción bicatenaria del dsRNA y la diana.

5 Alternativamente, la identidad de la molécula de RNA bicatenario con la secuencia diana puede definirse también incluyendo el colgante 3', particularmente un colgante que tiene una longitud de 1-3 nucleótidos. En este caso, la identidad de secuencia es preferiblemente al menos 70% y muy preferiblemente al menos 85% de la secuencia diana. Por ejemplo, los nucleótidos del colgante 3' y hasta dos nucleótidos del término 5' y/o 3' de la doble cadena pueden estar modificados sin pérdida importante de actividad.

La molécula de RNA bicatenario de la invención se puede preparar por un método que comprende los pasos:

10 (a) síntesis de dos cadenas de RNA cada una de las cuales tiene una longitud de 19-25, v.g., de 19-23 nucleótidos, en donde dichas cadenas de RNA son capaces de formar una molécula de RNA bicatenario, en donde preferiblemente al menos una cadena tiene un colgante 3' de 1-5 nucleótidos,

(b) combinación de las cadenas de RNA sintetizadas en condiciones en las cuales se forma una molécula de RNA bicatenario que es capaz de mediar modificaciones del ácido nucleico específicas de la diana, particularmente
15 interferencia de RNA y/o metilación de DNA.

Métodos de síntesis de moléculas de RNA se conocen en la técnica. En este contexto, se hace referencia particularmente a métodos de síntesis química como se describen en Verma y Eckstein (1998).

20 Los RNAs monocatenarios se pueden preparar también por transcripción enzimática a partir de moldes de DNA sintético o de plásmidos de DNA aislados de bacterias recombinantes. Típicamente, se utilizan RNA-polimerasas de fago tales como las RNA-polimerasas T7, T3, o SP6 (Milligan y Uhlenbeck (1989)).

Se describe adicionalmente un método de mediación de modificaciones de ácido nucleico específicas de la diana, particularmente interferencia de RNA y/o metilación de DNA en una célula o un organismo, que comprende los pasos:

25 (a) puesta en contacto la célula u organismo con la molécula de RNA bicatenario de la invención en condiciones en las cuales pueden ocurrir modificaciones del ácido nucleico específicas de la diana y

(b) mediación de una modificación de ácido nucleico específica de la diana efectuada por el RNA bicatenario hacia un ácido nucleico diana que tiene una porción de secuencia que corresponde sustancialmente al RNA bicatenario.

30 El paso de puesta en contacto (a) puede comprender la introducción de la molécula de RNA bicatenario en una célula diana, v.g. una célula diana aislada, v.g. en cultivo de células, un microorganismo unicelular o una célula diana o una pluralidad de células diana en un organismo multicelular. En el paso de introducción puede comprender una administración mediada por portador, v.g., por portadores liposómicos o por inyección.

35 El método descrito puede utilizarse para determinar la función de un gen en una célula o un organismo o incluso para modulación de la función de un gen en una célula o un organismo, que es capaz de mediación de la interferencia de RNA. La célula puede ser una célula o una línea de células eucariota, v.g., una célula vegetal o una célula animal, tal como una célula de mamífero, v.g. una célula embrionaria, una célula madre pluripotente, una célula tumoral, v.g. una célula de teratocarcinoma o una célula infectada por virus. El organismo puede ser un organismo eucariota, v.g. una planta o un animal, tal como un mamífero, particularmente un humano.

40 El gen diana al que está dirigida la molécula de RNA de la invención puede estar asociado con una condición patológica. Por ejemplo, el gen puede ser un gen asociado a un patógeno, v.g. un gen viral, un gen asociado a un tumor o un gen asociado a una enfermedad autoinmune. El gen diana puede ser también un gen heterólogo expresado en una célula recombinante o un organismo alterado genéticamente. Por determinación o modulación, particularmente, inhibición de la función de un gen de este tipo, pueden obtenerse información valiosa y beneficios terapéuticos en el campo de la agricultura o en el campo de la medicina o medicina veterinaria.

45 El dsRNA se administra usualmente como una composición farmacéutica. La administración puede llevarse a cabo por métodos conocidos, en donde un ácido nucleico se introduce en una célula diana deseada in vitro o in vivo. Técnicas de transferencia de genes utilizadas comúnmente incluyen los métodos de fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación y microinyección y métodos virales (Graham, F.L. y van der Eb, A.J. (1973) *Virology* 52, 456; McCutchan, J.H. y Pagano, J.S. (1968), *J. Natl. Cancer Inst.* 41, 351; Chu, G. et al (1987), *Nucl. Acids Res.* 15, 1311; Fraley, R. et al. (1980), *J. Biol. Chem.* 255, 10431; Capecchi, M.R. (1980), *Cell* 22, 479). Una adición reciente a este arsenal de técnicas para la introducción de DNA en células es el uso de liposomas catiónicos (Felgner, P.L. et
50

al. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413). Formulaciones de lípidos catiónicos disponibles comercialmente son v.g. Tfx 50 (Promega) o Lipofectamin 2000 (Life Technologies).

5 Así pues, la invención se refiere también a una composición farmacéutica que contiene como agente activo al menos una molécula de RNA bicatenario como se describe anteriormente y un portador farmacéutico. La composición puede utilizarse para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas en medicina humana o en medicina veterinaria.

10 Para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas, la composición puede encontrarse en forma de una solución, v.g. una solución inyectable, una crema, ungüento, tableta, suspensión o análoga. La composición puede administrarse de cualquier manera adecuada, v.g. por inyección, por aplicación oral, tópica, nasal, rectal, etc. El portador puede ser cualquier portador farmacéutico adecuado. Preferiblemente se utiliza un portador que es capaz de aumentar la eficacia de las moléculas de RNA para penetrar en las células diana. Ejemplos adecuados de tales portadores son liposomas, particularmente liposomas catiónicos. Un método de administración adicional preferido es la inyección.

15 Una aplicación descrita adicionalmente del método RNAi es un análisis funcional de células eucariotas, u organismos eucariotas no humanos, preferiblemente células u organismos de mamífero y muy preferiblemente células humanas, v.g. líneas de células tales como HeLa o 293 o de roedores, v.g. ratas y ratones. Por transfección con moléculas de RNA bicatenario adecuadas de acuerdo con la invención que son homólogas a un gen diana predeterminado o moléculas de DNA que codifican una molécula de RNA bicatenario adecuada puede obtenerse un fenotipo de desactivación específico, en una célula diana, v.g. en cultivo de células o en un organismo diana. Sorprendentemente, se encontró que la presencia de moléculas de RNA bicatenario corto no da como resultado una respuesta de interferón por la célula hospedadora u organismo hospedador.

20 Así pues, se describe adicionalmente en esta memoria una célula eucariota o un organismo eucariota no humano que exhibe un fenotipo de desactivación específico del gen diana que comprende una expresión al menos parcialmente deficiente de al menos un gen diana endógeno en donde dicha célula u organismo está transfectada con al menos una molécula de RNA bicatenario de acuerdo con la invención capaz de inhibir la expresión de al menos un gen diana endógeno o con un DNA que codifica al menos una molécula de RNA bicatenario capaz de inhibir la expresión de al menos un gen diana endógeno. Debe observarse que la presente invención permite una desactivación específica de la diana de varios genes endógenos diferentes debido a la especificidad de la RNAi.

25 Fenotipos de desactivación específicos de genes de células u organismos no humanos, particularmente de células humanas o mamíferos no humanos pueden utilizarse en procedimientos analíticos, v.g. en el análisis funcional y/o fenotípico de procesos fisiológicos complejos tales como el análisis de perfiles de expresión de genes y/o proteomas. Por ejemplo, es posible preparar los fenotipos de silenciamiento de genes humanos en células cultivadas que se supone son reguladoras de procesos de remodelación alternativos. Entre estos genes se encuentran particularmente los miembros de la familia de factores de remodelación SR, v.g. ASF/SF2, SC35, SRp20, SRp40 o SRp55. Adicionalmente, puede analizarse el efecto de las proteínas SR sobre los perfiles de mRNA de genes remodelados predeterminados alternativamente tales como CD44. Preferiblemente, el análisis se lleva a cabo por métodos de alta capacidad que utilizan chips basados en oligonucleótidos.

35 Utilizando tecnologías de desactivación basadas en RNAi, la expresión de un gen diana endógeno puede inhibirse en una célula diana o un organismo diana. El gen endógeno puede estar complementado por un ácido nucleico diana exógeno que codifica la proteína diana o una forma variante o mutada de la proteína diana, v.g. un gen o un cDNA, que puede fusionarse opcionalmente a una secuencia de ácido nucleico adicional que codifica un péptido o polipéptido detectable, v.g., un identificador de afinidad, particularmente un identificador de afinidad múltiple. Variantes o formas mutadas del gen diana difieren del gen diana endógeno en que las mismas codifican un producto génico que difiere del producto génico endógeno al nivel de aminoácidos por sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos simples o múltiples. Las variantes o formas mutadas pueden tener la misma actividad biológica que el gen diana endógeno. Por otra parte, la variante o el gen diana mutado puede tener también una actividad biológica, que difiere de la actividad biológica del gen diana endógeno, v.g., una actividad parcialmente delecionada, una actividad completamente delecionada, una actividad intensificada, etc.

40 La complementación puede realizarse por coexpresión del polipéptido codificado por el ácido nucleico exógeno, v.g. una proteína de fusión que comprende la proteína diana y el identificador de afinidad y la molécula de RNA bicatenario para silenciamiento del gen endógeno en la célula diana. Esta coexpresión puede realizarse utilizando un vector de expresión adecuado que expresa a la vez el polipéptido codificado por el ácido nucleico exógeno, v.g. la proteína diana modificada por el identificador y la molécula de RNA bicatenario o, alternativamente, por utilización de una combinación de vectores de expresión. Las proteínas y complejos proteínicos que se sintetizan de novo en la célula diana contendrán el producto del gen exógeno, v.g. la proteína de fusión modificada. Con objeto de evitar la supresión de la expresión del producto del gen exógeno por la molécula dúplex de RNAi, la secuencia de nucleótidos que codifica el ácido nucleico exógeno puede estar alterada al nivel del DNA (causando o no mutaciones al nivel de aminoácidos) en la parte de la secuencia que es homóloga a la molécula de RNA bicatenario. Alternativamente, el gen diana endógeno puede estar complementado por secuencias de nucleótidos correspondientes de otras especies, v.g., de ratón.

Una aplicación adecuada para la célula u organismo descrito en esta memoria es el análisis de los perfiles de expresión de genes y/o proteomas. En una realización especialmente preferida, se lleva a cabo un análisis de una forma variante o mutante de una o varias proteínas diana, en donde dichas formas variantes o mutantes son reintroducidas en la célula u organismo por un ácido nucleico diana exógeno como se ha descrito arriba. La combinación de desactivación de un gen endógeno y rescate por utilización de una diana mutada, v.g. una diana exógena parcialmente direccionada, presenta ventajas comparada con el uso de una célula desactivada. Adicionalmente, este método es particularmente adecuado para identificación de dominios funcionales de la proteína diana. En una realización preferida adicional, se lleva a cabo una comparación, v.g. de los perfiles de expresión de genes y/o proteomas y/o características fenotípicas de al menos dos células u organismos. Estos organismos se seleccionan de:

- (i) una célula de control u organismo de control sin inhibición del gen diana,
- (ii) una célula u organismo con inhibición del gen diana y
- (iii) una célula u organismo con inhibición del gen diana más complementación del gen diana por un ácido nucleico diana exógeno.

El método y la célula descritos en esta memoria son adecuados también en un procedimiento para identificación y/o caracterización de agentes farmacológicos, v.g. identificación de nuevos agentes farmacológicos a partir de una colección de sustancias de test y/o caracterización de mecanismos de acción y/o efectos secundarios de agentes farmacológicos conocidos.

Se describe adicionalmente en esta memoria un sistema para identificación y/o caracterización de agentes farmacológicos que actúan sobre al menos una proteína diana, que comprende:

- (a) una célula eucariota o un organismo eucariota no humano capaz de expresar al menos un gen diana endógeno que codifica dicha proteína diana,
- (b) al menos una molécula de RNA bicatenario capaz de inhibir la expresión de dicho al menos un gen diana endógeno, y
- (c) una sustancia de test o una colección de sustancias de test en donde las propiedades farmacológicas de dicha sustancia de test o dicha colección deben identificarse y/o caracterizarse.

Adicionalmente, el sistema que se ha descrito arriba puede comprender:

- (d) al menos un ácido nucleico diana exógeno que codifica la proteína diana o una forma variante o mutada de la proteína diana en donde dicho ácido nucleico diana exógeno difiere del gen diana endógeno al nivel del ácido nucleico de tal modo que la expresión del ácido nucleico diana exógeno es sustancialmente menos inhibida por la molécula de RNA bicatenario que la expresión del gen diana endógeno.

Adicionalmente, el método de complementación de la desactivación del RNA puede utilizarse para propósitos preparativos, v.g. para la purificación por afinidad de proteínas o complejos proteínicos de células eucariotas, particularmente células de mamífero y más particularmente células humanas. El ácido nucleico diana exógeno puede codificar una proteína diana que está fusionada a un identificador de afinidad.

El método preparativo puede emplearse para la purificación de complejos de proteínas de peso molecular alto que tienen preferiblemente una masa de ≥ 150 kD y más preferiblemente de ≥ 500 kD, y que pueden contener opcionalmente ácidos nucleicos tales como RNA. Ejemplos específicos son el complejo de proteínas heterotrímico constituido por las proteínas de 20 kD, 60 kD y 90 kD de la partícula U4/U6 snRNP, el factor de remodelación SF3b del 17S U2 snRNP constituido por 5 proteínas que tienen pesos moleculares de 14, 19, 120, 145 y 155 kD y la partícula 25S U4/U6/U5 tri-snRNP que contiene las moléculas U4, U5 y U6 snRNA y aproximadamente 30 proteínas, que tiene un peso molecular de aproximadamente 1,7 MD.

Este método es adecuado para análisis funcional de proteomas en células de mamífero, particularmente células humanas.

Adicionalmente, la presente invención se explica con mayor detalle en las figuras y ejemplos que siguen.

Leyendas de las Figuras

Figura 1: Un RNA bicatenario tan corto como 38 pb puede mediar la RNAi.

(A) Representación gráfica de dsRNAs utilizados para direccionamiento de mRNA Pp-luc. Se prepararon 3 series de dsRNAs con extremos romos que abarcaban un rango de 29 a 504 pb. La posición del primer nucleótido en la cadena sentido del dsRNA se indica con relación al codón inicial de mRNA Pp-luc (p1). (B) Ensayo de interferencia del RNA (Tuschl et al., 1999). Se normalizaron los ratios de actividad de Pp-luc diana a Rr-luc de control a un control de tampón (barra negra). Se preincubaron dsRNAs (5 nM) en lisado de *Drosophila* durante 15 min a 25°C antes de

la adición de mRNAs Pp-luc y Rr-luc protegidos en el casquete con 7-metil-guanosina (~ 50 pM). La preincubación se continuó durante una hora más y se analizó luego por el ensayo dual de luciferasa (Promega). Los datos son el valor medio de al menos 4 experimentos independientes \pm la desviación estándar.

Figura 2: Un dsRNA de 29 pb ya no se procesa a fragmentos de 21-23 nt.

- 5 Evolución temporal de la formación de 21-23 meros a partir del procesamiento de dsRNAs marcados internamente con ^{32}P (5 nM) en el lisado de *Drosophila*. Se indican la longitud y la fuente del dsRNA. Se ha cargado un marcador de tamaño del RNA (M) en la pista izquierda y se indican los tamaños de los fragmentos. Las bandas dobles en el tiempo cero se deben a dsRNA incompletamente desnaturalizado.

Figura 3: Los dsRNAs cortos escinden la diana de mRNA una sola vez.

- 10 (A) Electroforesis en gel desnaturalizante de los productos de escisión 5' estables producidos por incubación durante 1 hora de RNA 10 nM sentido o antisentido marcado con ^{32}P en el casquete con dsRNAs 10 nM de la serie p133 en lisado de *Drosophila*. Se generaron marcadores de longitud por digestión parcial con nucleasa T1 e hidrólisis alcalina parcial (OH) del RNA diana marcado en el casquete. Las regiones direccionadas por los dsRNAs se indican como barras negras a ambos lados. Se muestra el espaciamiento de 20-23 nt entre los sitios de escisión predominantes para el dsRNA de 111 pb de longitud. La flecha horizontal indica escisión inespecífica no debida a RNAi. (B) Posición de los sitios de escisión en los RNAs diana sentido y antisentido. Las secuencias de los RNAs diana sentido de 177 nt y antisentido de 180 nt se representan en orientación antiparalela de tal modo que las secuencias complementarias se oponen una a otra. Las regiones direccionadas por los diferentes dsRNAs se indican por barras de color diferente posicionadas entre las secuencias diana sentido y antisentido. Los sitios de escisión se indican por círculos: círculo grande para escisión fuerte, círculo pequeño para escisión débil. El grupo fosfato radiomarcado con ^{32}P está señalado por un asterisco.
- 15
20

Figura 4: Fragmentos de RNA de 21 y 22 nt son generados por un mecanismo semejante a RNasa III.

- (A) Secuencias de RNAs de ~ 21 nt después del procesamiento del dsRNA. Los fragmentos de RNA de ~ 21 nt generados por procesamiento del dsRNA se clonaron y secuenciaron direccionalmente. Los oligorribonucleótidos que se originaron a partir de la cadena sentido del dsRNA se indican como líneas azules, y los originados por la cadena antisentido como líneas rojas. Se utilizan barras gruesas si estaba presente la misma secuencia en clones múltiples, indicando el número a la derecha la frecuencia. Los sitios de escisión de RNA diana mediados por el dsRNA se indican como círculos anaranjados, círculo grande para escisión fuerte, círculo pequeño para escisión débil (véase Figura 3B). Los círculos encima de la cadena sentido indicaban sitios de escisión dentro de la diana sentido y los círculos en el fondo del dsRNA indican el sitio de escisión en la diana antisentido. Se identificaron hasta 5 nucleótidos adicionales en fragmentos de ~ 21 nt derivados de los extremos 3' del dsRNA. Estos nucleótidos son combinaciones aleatorias de residuos predominantemente C, G, o A y se añadieron muy probablemente en una modalidad sin molde durante la transcripción por T7 de las cadenas constitutivas del dsRNA. (B) análisis bidimensional por TLC de la composición de nucleótidos de los RNAs de ~ 21 nt. Los RNAs de ~ 21 nt se generaron por incubación de dsRNA Pp-luc de 504 pb radiomarcado internamente en lisado de *Drosophila*, se purificaron en gel, y se digirieron luego a mononucleótidos con nucleasa P1 (fila superior) o ribonucleasa T2 (fila inferior). El dsRNA se radiomarcó internamente por transcripción en presencia de uno de los nucleosido-trifosfatos α - ^{32}P indicados. La radiactividad se detectó por producción de imágenes por luminiscencia. Los nucleosido-5'-monofosfatos, nucleosido-3'-monofosfatos, nucleosido-5',3'-difosfatos, y el fosfato inorgánico se indican como pN, Np, pNp, y p_i , respectivamente. Los círculos negros indican puntos de absorción UV de nucleótidos portadores no radiactivos. Los 3',5'-bisfosfatos (círculos rojos) se identificaron por co-migración con estándares radiomarcados preparados por fosforilación en 5' de nucleosido-3'-monofosfatos con polinucleótido-quinasa T4 y γ - ^{32}P -ATP.
- 25
30
35
40

Figura 5: Los RNAs sintéticos de 21 y 22 nt median la escisión del RNA diana.

- (A) Representación gráfica de dsRNA de control de 52 pb y dsRNAs sintéticos de 21 y 22 nt. La cadena sentido de RNAs de interferencia cortos de 21 y 22 nt (siRNAs) se representa en azul, y la cadena antisentido en rojo. Las secuencias de los siRNAs se derivaban de los fragmentos clonados de dsRNAs de 52 y 111 pb (Figura 4A), excepto en lo que respecta a la cadena antisentido de 22 nt del dúplex 5. Los siRNAs en los dúplex 6 y 7 eran exclusivos para la reacción de procesamiento del dsRNA de 111 pb. Los dos nucleótidos colgantes 3' indicados en verde están presentes en la secuencia de la cadena sintética antisentido de los dúplex 1 y 3. Ambas cadenas del dsRNA de control de 52 pb se prepararon por transcripción in vitro y una fracción de los transcritos puede contener adición de nucleótidos 3' sin molde. Los sitios de escisión del RNA diana direccionados por los dúplex de siRNA se indican como círculos anaranjados (véase la leyenda para la Figura 4A) y se determinaron como se muestra en la Figura 5B. (B) Posición de los sitios de escisión en los RNAs diana sentido y antisentido. Las secuencias de RNA diana son como se describe en la Figura 3B. El dsRNA de control de 52 pb (10 nM) o los dúplex de RNA 1-7 de 21 y 22 nt (100 nM) se incubaron con RNA diana durante 2,5 horas a 25°C en lisado de *Drosophila*. Los productos de escisión 5' estables se resolvieron en el gel. Los sitios de escisión se indican en la Figura 5A. La región direccionada por el dsRNA de 52 pb o las cadenas sentido (s) o antisentido (as) se indican por las barras negras al lado del gel. Los sitios de escisión están localizados todos ellos en la reacción de identidad de los dsRNAs. Para determinación precisa de los sitios de escisión de la cadena antisentido se utilizó un gel de menor porcentaje.
- 45
50
55

Figura 6: Los colgantes 3' largos en los dsRNAs cortos inhiben la RNAi.

(A) Representación gráfica de constructos dsRNA de 52 pb. Las extensiones 3' de las cadenas sentido y antisentido se indican en azul y rojo, respectivamente. Los sitios de escisión observados en los RNAs diana se representan como círculos anaranjados análogos a la Figura 4A y se determinan como se muestra en la Figura 6B. (B) Posición de los sitios de escisión en los RNAs diana sentido y antisentido. Las secuencias RNA diana son como se describe en la Figura 3B. Se incubó el dsRNA (10 nM) con RNA diana durante 2,5 horas a 25°C en lisado de *Drosophila*. Los productos de escisión 5' estables se resolvieron en el gel. Los sitios de escisión principales se indican con una flecha horizontal y se representan también en la Figura 6A. La región direccionada por el dsRNA de 52 pb se representa como barra negra a ambos lados del gel.

10 **Figura 7:** Modelo Propuesto para la RNAi.

Se ha predicho que la RNAi comienza con el procesamiento de dsRNA (cadena sentido en negro, cadena antisentido en rojo) a RNAs de interferencia cortos de 21 y 22 nt (siRNAs) predominantemente. Los nucleótidos 3' colgantes cortos, si están presentes en el dsRNA, pueden ser beneficiosos para procesamiento de dsRNAs cortos. Las proteínas de procesamiento de dsRNA, que quedan por caracterizar, se representan como óvalos verdes y azules, y están ensambladas en el dsRNA de manera asimétrica. En el modelo de los autores de la presente invención, esto se ilustra por fijación de una proteína o dominio de proteína hipotético azul con la cadena siRNA en dirección 3' a 5', mientras que la proteína o dominio de proteína hipotético verde se fija siempre a la cadena de siRNA opuesta. Estas proteínas o un subconjunto de las mismas se mantienen asociadas con el dúplex de siRNA y conservan su orientación como se determina por la dirección de la reacción de procesamiento del dsRNA. Únicamente la secuencia de siRNA asociada con la proteína azul es capaz de guiar la escisión del RNA diana. El complejo de endonucleasas se designa como complejo de ribonucleoproteínas interferentes pequeñas o siRNP. Se supone aquí que la endonucleasa que escinde el dsRNA puede escindir también el RNA diana, probablemente por desplazamiento temporal de la cadena de siRNA pasiva no utilizada para reconocimiento de la diana. El RNA diana se escinde luego en el centro de la región reconocida por el siRNA guía complementario de la secuencia.

25 **Figura 8:** Constructos informadores y dúplex de siRNA.

(a) Se ilustran las regiones de genes informadores de luciferasa de luciérnaga (Pp-luc) y pensamiento de mar (Rr-luc) de los plásmidos pGL2-Control, pGL3-Control y pRL-TK (Promega). Se indican los elementos reguladores SV40, el promotor de timidina-quinasa HSV y dos intrones (líneas). La secuencia de luciferasa GL3 es idéntica en un 95% a GL2, pero RL no está emparentada en absoluto con ambas. La expresión de luciferasa de pGL2 es aproximadamente 10 veces menor que la de pGL3 en células de mamífero transfectadas. La región direccionada por los dúplex de siRNA se indica como una barra negra bajo la región codificante de los genes de luciferasa. (b) Se muestran las secuencias sentido (superior) y antisentido (inferior) de los dúplex de siRNA que direccionan luciferasa GL2, G3 y RL. Los dúplex de siRNA GL2 y GL3 difieren sólo en 3 sustituciones de nucleótidos simples (recuadradas en gris). Como control inespecífico, se sintetizó un dúplex con la secuencia GL2 invertida, invGL2. El colgante 3' de 2 nt de la 2'-desoxitimidina se indica como TT; uGL2 es similar a siRNA GL2, pero contiene colgantes 3' de ribouridina.

Figura 9: Interferencia de RNA por los dúplex siRNA.

Las ratios de luciferasa diana de control se normalizaron a un control de tampón (bu, barras negras); las barras grises indican las ratios de luciferasa GL2 o GL3 de *Photinus pyralis* (Pp-luc) a luciferasa RL de *Renilla reniformis* (Rr-luc) (eje izquierdo), las barras blancas indican las ratios de RL a GL2 o GL3 (eje derecho). Los paneles a, c, e, g e i describen experimentos realizados con la combinación de plásmidos informadores pGL2-Control y pRL-TK, y los paneles b, d, f, h y j con pGL3-Control y pRL-TK informadores. La línea de células utilizada para el experimento de interferencia se indica en la parte superior de cada gráfica. Las ratios de Pp-luc/Rr-luc para el control de tampón (bu) variaban entre 0,5 y 10 para pGL2/pRL y entre 0,03 y 1 para pGL3/pRL, respectivamente, antes de la normalización y entre las diversas líneas de células testadas. Los datos del gráfico se promediaron a partir de 3 experimentos independientes \pm S.D.

Figura 10: Efectos de siRNA de 21 nt, y dsRNAs de 50 pb y 500 pb sobre la expresión de luciferasa en células HeLa.

La longitud exacta de los dsRNAs largos se indica bajo las barras. Los paneles a, c y e describen experimentos realizados con los plásmidos informadores pGL2-Control y pRL-TK, los paneles b, d y f con los plásmidos informadores pGL3-Control y pRL-TK. Los datos se promediaron a partir de dos experimentos independientes \pm S.D. (a) y (b) expresión absoluta de Pp-luc, representada gráficamente en unidades de luminiscencia arbitrarias. (c), (d) expresión de Rr-luc, representada gráficamente en unidades de luminiscencia arbitrarias. (e), (f) ratios de diana normalizada a luciferasa de control. Las ratios de actividad de luciferasa para los dúplex de siRNA se normalizaron a un control de tampón. (bu, barras negras); las ratios de luminiscencia para dsRNAs de 50 ó 500 pb se normalizaron a las ratios respectivas observadas para dsRNA de 50 y 500 pb de GFP humanizada (hG, barras negras). Debe observarse que las diferencias globales en secuencias entre los dsRNAs de 49 y 484 pb que direccionaban GL2 y

GL3 no son suficientes para conferir especificidad entre las dianas GL2 y GL3 (identidad no interrumpida de 43 nt en el segmento de 49 pb, 239 nt de identidad ininterrumpida máxima en el segmento de 484 pb).

Figura 11: Variación del colgante 3' de los dúplex de siRNAs de 21 nt.

(A) Reseña de la estrategia experimental. El mRNA diana sentido protegido en el casquete y poliadenilado se representa gráficamente y se muestran las posiciones relativas de los siRNAs sentido y antisentido. Se prepararon 8 series de dúplex, de acuerdo con las 8 cadenas antisentido diferentes. Las secuencias de siRNA y el número de nucleótidos colgantes se cambiaron en pasos de 1-nt. (B) Luminiscencia relativa normalizada de luciferasa diana (*Photinus pyralis*, Pp-luc) a luciferasa de control (*Renilla reniformis*, Rr-luc) en lisado de embrión de *D. melanogaster* en presencia de dsRNAs de 5 nM con extremos romos. Los ratios de luminiscencia determinadas en presencia de dsRNA se normalizaron a la ratio obtenida para un control de tampón (bu, barras negras). Los ratios normalizados menores que 1 indican interferencia específica. (C-J) Ratios de interferencia normalizadas para 8 series de dúplex de siRNA de 21 nt. Las secuencias de dúplex de siRNA se representan encima de los gráficos de barras. Cada panel muestra la ratio de interferencia para una serie de dúplex formados con un siRNA guía dado antisentido y 5 siRNAs sentido diferentes. El número de nucleótidos colgantes (colgante 3', números positivos; colgantes 5', números negativos) se indica en el eje x. Los puntos de datos se promediaron a partir de al menos 3 experimentos independientes, y las barras de error representan las desviaciones estándar.

Figura 12: Variación de la longitud de la cadena sentido de los dúplex de siRNA.

(A) Representación gráfica del experimento. Se aparearon tres cadenas antisentido de 21 nt con 8 siRNAs sentido. Los siRNAs se modificaron en longitud en su extremo 3'. El colgante 3' del siRNA antisentido era de 1 nt (B), 2 nt (C), o 3 nt (D), mientras que el colgante de siRNA sentido variaba para cada serie. Se indican las secuencias de los dúplex de siRNA y las ratios de interferencia diferentes.

Figura 13: Variación de la longitud de los dúplex de siRNA con colgantes 3' de 2 nt protegidos.

(A) Representación gráfica del experimento. El dúplex de siRNA de 21 nt es idéntico en secuencia al representado en la Figura 11 H o 12C. Los dúplex de siRNA se extendieron al lado 3' del siRNA sentido (B) o el lado 5' del siRNA sentido (C). Se indican las secuencias de los dúplex siRNA y la ratio de interferencias respectivas.

Figura 14: Sustitución de los grupos 2'-hidroxilo de los residuos ribosa del siRNA.

Los grupos 2'-hidroxilo (OH) en las cadenas de los dúplex siRNA se reemplazaron por 2'-desoxi (d) o 2'-O-metilo (Me). Las sustituciones 2'-desoxi de 2 nt y 4 nt en los extremos 3' se indican como 2-nt d y 4-nt d, respectivamente. Los residuos uridina se reemplazaron por 2'-desoxi-timidina.

Figura 15: Mapeado de la escisión del RNA diana sentido y antisentido por los dúplex de siRNA de 21 nt con colgantes 3' de 2 nt.

(A) Representación gráfica de los dúplex de RNAs y siRNA diana sentido y antisentido marcados en el casquete con ^{32}P (asterisco) y. La posición de la escisión del RNA diana sentido y antisentido se indica por triángulos encima y debajo de los dúplex de siRNA, respectivamente. (B) Mapeado de los sitios de escisión del RNA diana. Después de 2 horas de incubación de diana 10 nM con dúplex de siRNA 100 nM en lisado de embrión de *D. melanogaster*, el sustrato marcado en el casquete en 5' y los productos de escisión 5' se resolvieron en geles de secuenciación. Se generaron marcadores de longitud por digestión parcial con RNasa T1 (T1) e hidrólisis alcalina parcial (OH-) de los RNAs diana. Las líneas en negrita a la izquierda de las imágenes indican la región abarcada por las cadenas de siRNA 1 y 5 de la misma orientación que la diana.

Figura 16: El extremo 5' de un siRNA guía define la posición de escisión del RNA diana.

(A, B) Representación gráfica de la estrategia experimental. El siRNA antisentido era el mismo en todos los dúplex de siRNA, pero la cadena sentido estaba modificada entre los nt 18 y 25 por cambio del extremo 3' (A) o 18 a 23 nt por cambio del extremo 5' (B). La posición de escisión del RNA diana sentido y antisentido se indica por triángulos encima y debajo de los dúplex de siRNA, respectivamente. (C, D) Análisis de la escisión del RNA diana utilizando RNAs diana sentido (panel superior) o antisentido (panel inferior) marcados en el casquete. Se muestran únicamente los productos de escisión 5' marcados en el casquete. Se indican las secuencias de los dúplex de siRNA, y la longitud de las cadenas de siRNA sentido está marcada en la parte superior del panel. La pista de control marcada con un guión en el panel (C) muestra el RNA diana incubado en ausencia de siRNAs. Los marcadores eran como se describe en la Figura 15. Las flechas en (D), panel inferior, indican los sitios de escisión de RNA diana que difieren en 1 nt.

Figura 17: Variación de secuencia del colgante 3' de los dúplex de siRNA.

El colgante 3' de 2 nt (NN, en gris) se modificó en secuencia y composición como se indica (T, 2'-desoxitimidina, dG, 2'-desoxiguanosina; asterisco, dúplex de siRNA de tipo salvaje). Las ratios de interferencia normalizadas se

determinaron como se describe en la Figura 11. La secuencia de tipo salvaje es la misma que se representa en la Figura 14.

Figura 18: Especificidad de secuencia del reconocimiento de la diana.

5 Se muestran las secuencias de los dúplex de siRNA desapareados, y los segmentos de secuencia o nucleótidos simples modificados están intensificados en gris. El dúplex de referencia (ref) y los dúplex de siRNA 1 a 7 contienen colgantes 2'-desoxitimidina de 2 nt. La eficiencia de silenciamiento del dúplex de referencia modificado con timidina era comparable a la secuencia de tipo salvaje (Figura 17). Las ratios de interferencia normalizadas se determinaron como se describe en la Figura 11.

Figura 19: Variación de la longitud de los dúplex de siRNA con colgantes 3' de 2 nt preservados.

10 Los dúplex de siRNA se extendieron al lado 3' del siRNA sentido (A) o el lado 5' del siRNA sentido (B). Se indican las secuencias de los dúplex de siRNA y las ratios de interferencia respectivas. Para las células HeLa SS6, se transfectaron dúplex de siRNA (0,84 µg) que direccionaban luciferasa GL2 junto con plásmidos pGL2-Control y pRL-TK. Para comparación, se indican las actividades in vitro de RNAi de dúplex de siRNA testados en lisado de *D. melanogaster*.

15 Ejemplo 1

Interferencia de RNA Mediada por RNAs Sintéticos Pequeños

1.1. Procedimientos Experimentales

1.1.1 RNAi in Vitro

20 Se realizaron preparaciones in vitro de RNAi y lisado como se ha descrito previamente (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). Es crítico utilizar creatina-quinasa recién disuelta (Roche) para la regeneración óptima de ATP. Los ensayos de traducción de RNAi (Fig. 1) se realizaron con concentraciones de dsRNA de 5 nM y un periodo de preincubación prolongada de 15 min a 25°C antes de la adición de mRNAs informadores Pp-luc y Rr-luc transcritos in vitro, con casquete y poliadenilados. La incubación se continuó durante 1 hora y se analizó la cantidad relativa de proteína Pp-luc y Rr-luc utilizando el ensayo dual de luciferasa (Promega) y un luminómetro Monolight 3010C (PharMingen).

1.1.2 Síntesis del RNA

30 Se utilizaron procedimientos estándar para transcripción in vitro de RNA a partir de moldes PCR que llevaban secuencias promotoras T7 o SP6, véase por ejemplo (Tuschl et al., 1998). Se preparó RNA sintético utilizando fosforamiditos RNA Expedite (Proligo). El oligonucleótido adaptador 3' se sintetizó utilizando dimetoxitritil-1,4-bencenodimetanol-succinil-amidopropil-CPG. Los oligorribonucleótidos se desprotegeron en 3 ml de 32% amoníaco/etanol (3/1) durante 4 horas a 55°C (RNA Expedite) o 16 horas a 55°C (oligonucleótidos quiméricos DNA/RNA con adaptadores 3' y 5') y se deslilaron y purificaron luego en gel como se ha descrito anteriormente (Tuschl et al., 1993). Se generaron transcritos de RNA para preparación de dsRNA que incluían colgantes 3' largos a partir de moldes PCR que contenían un promotor T7 en dirección sentido y un promotor SP6 en dirección antisentido. El molde de transcripción para el RNA diana sentido y antisentido se amplificó por PCR con GCGTAATACGACTCACTATAGAACAAATTGCTTTTA- CAG (subrayado, promotor T7) como cebador 5' y ATTTAGGTGACACTATAGGCATAAAGAATTGAAGA (subrayado, promotor SP6) como cebador 3' y el plásmido Pp-luc linealizado (secuencia pGEM-luc) (Tuschl et al., 1999) como molde; el RNA sentido transcrito por T7 tenía una longitud de 177 nt, con la secuencia Pp-luc entre las posiciones 113 y 273 con relación al codón de inicio y seguido por 17 nt del complemento de la secuencia promotora SP6 en el extremo 3'. Los transcritos para la formación de dsRNA con extremos romos se prepararon por transcripción de dos productos PCR diferentes que contenían sólo una secuencia promotora simple.

45 La reasociación del dsRNA se llevó a cabo utilizando una extracción con fenol/cloroformo. Se incubaron concentraciones equimolares de RNA sentido y antisentido (50 nM a 10 µM, dependiendo de la longitud y cantidad disponibles) en NaOAc 0,3 M (pH 6) durante 30 s a 90°C y se extrajeron luego a la temperatura ambiente con un volumen igual de fenol/cloroformo, seguido por una extracción con cloroformo para eliminar el fenol residual. El dsRNA resultante se precipitó por adición de 2,5-3 volúmenes de etanol. El pellet se disolvió en tampón de lisis (KCL 100 mM, HEPES-KOH 30 mM, pH 7,4, Mg (OAc)₂ 2 mM), y la calidad del dsRNA se comprobó por electroforesis estándar en gel de agarosa en tampón 1 x TAE. Los dsRNAs de 52 pb con los colgantes 3' de 17 nt y 20 nt (Figura 6) se reasociaron por incubación durante 1 minuto a 95°C, después de lo cual se enfriaron rápidamente a 70°C seguido por enfriamiento lento a la temperatura ambiente durante un periodo de 3 horas (reacción de asociación de 50 µl, concentración de cadena 1 µM, NaCl 300 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5). Los dsRNAs se extrajeron luego con fenol/cloroformo, se precipitaron con etanol y se disolvieron en tampón de lisis.

55 La transcripción del RNA radiomarcado con ³²P internamente utilizado para la preparación de dsRNA (Figuras 2 y 4) se realizó utilizando ATP, CTP, GTP 1 mM, UTP 0,1 ó 0,2 mM, y ³²P UTP 0,2-0,3 µM (3000 Ci/milimol), o la ratio

respectiva para los nucleosido-trifosfatos radiomarcados distintos de UTP. La marcación del casquete de los RNAs diana se realizó como se ha descrito previamente. Los RNAs diana se purificaron en gel después de marcación en el casquete.

1.1.3 Mapeado del Sitio de Escisión

5 Se realizaron reacciones estándar de RNAi por pre-incubación de dsRNA 10 nM durante 15 min seguida por adición de RNA diana 10 nM marcado en el casquete. La reacción se paró después de una incubación adicional de 2 horas (Figura 2A) o 2,5 horas (Figura 5B y 6B) por tratamiento con proteinasa K (Tuschl et al., 1999). Las muestras se analizaron luego en geles de secuenciación al 8 ó 10%. Los dúplex de RNA sintético de 21 y 22 nt se utilizaron a una concentración final 100 nM (Fig. 5B).

10 1.1.4 Clonación de RNAs de ~ 21 nt

Los RNAs de 21 nt se produjeron por incubación de dsRNA radiomarcado en lisado de *Drosophila* en ausencia de RNA diana (reacción de 200 μ l, incubación de 1 h, dsP111 50 nM o dsP52 o dsP39 100 nM). La mezcla de reacción se trató subsiguientemente con proteinasa K (Tuschl et al., 1999) y los productos de procesamiento del dsRNA se separaron en un gel desnaturante de poliacrilamida al 15%. Se cortó una banda, que incluía un rango de tamaños de al menos 18 a 24 nt, se eluyó en NaCl 0,3 M durante una noche a 4°C y en tubos siliconizados. El RNA se recuperó por precipitación con etanol y se desfosforiló (reacción de 30 μ l, 30 min, 50°C, 10 U de fosfatasa alcalina, Roche). La reacción se paró por extracción con fenol-cloroformo y el RNA se precipitó con etanol. El oligonucleótido adaptador 3' (pUUUaaccgcacatctctcx: mayúsculas, RNA; minúsculas, DNA; p, fosfato; x, 4-hidroximetilbencilo) se ligó luego al RNA desfosforilado de ~ 21 nt (reacción de 20 μ l, 30 min, 37°C, adaptador 3' 5 μ M, Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, ATP 0,2 mM, 0,1 mg/ml BSA acetilada, 15% DMSO, 25 U RNA-ligasa T4, Amersham-Pharmacia) (Pan y Uhlenbeck, 1992). La reacción de ligación se paró por adición de un volumen igual de mezcla de parada urea 8 M/EDTA 50 mM y se cargó directamente en un gel al 15%. Los rendimientos de ligación eran mayores que 50%. El producto de ligación se recuperó del gel y se fosforiló en 5' (reacción de 20 μ l, 30 min, 37°C, ATP 2 mM, 5 U de polinucleótido-quinasa T4, NEB). La reacción de fosforilación se paró por extracción con fenol/cloroformo y el RNA se recuperó por precipitación con etanol. A continuación, el adaptador 5' (tactaatagcactactAAA: mayúsculas, RNA; minúsculas DNA) se ligó al producto de ligación fosforilado como se ha descrito arriba. El nuevo producto de ligación se purificó del gel y se eluyó de la rodaja de gel en presencia de cebador de la transcripción inversa (GACTAGCTGGAATTC AAGGATGCGGTTAAA: negrita, sitio EcoRI) utilizado como portador. La transcripción inversa (reacción de 15 μ l, 30 min, 42°C, 150 U de transcriptasa inversa Superscript II, Life Technologies) se siguió por PCR utilizando como cebador 5' CAGCCAACGGAATTCATACGACTCACTAAA (negrita, sitio EcoRI) y el cebador RT 3'. El producto PCR se purificó por extracción con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol. El producto PCR se digirió luego con Eco RI (NEB) y se concatemerizó utilizando DNA-ligasa T4 (alta concentración, NEB). Se separaron concatémeros de un rango de tamaños de 200 a 800 pb en un gel de agarosa de punto de fusión bajo, se recuperaron del gel por un procedimiento estándar de fusión y extracción con fenol, y se precipitaron con etanol. Los extremos no apareados se rellenaron por incubación con polimerasa Taq en condiciones estándar durante 15 min a 72°C y el producto DNA se ligó directamente al vector pCR2.1-TOPO utilizando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen). Las colonias se cribaron utilizando PCR y cebadores de secuenciación M13-20 y M13 Reverse. Los productos PCR se sometieron directamente a secuenciación por encargo (Sequence Laboratories Göttinger GmbH, Alemania). Como promedio, se obtuvieron 4 a 5 secuencias 21-meras por clon.

1.1.5 Análisis 2D-TLC

Se llevó a cabo una digestión con nucleasa P1 de los siRNAs radiomarcados y purificados del gel y 2D-TLC como se ha descrito (Zamore et al., 2000). La digestión con nucleasa T2 se realizó en reacciones de 10 μ l durante 3 horas a 50°C en acetato de amonio 10 mM (pH 4,5) utilizando 2 μ g/ μ l de tRNA portador y 30 U de ribonucleasa T2 (Life Technologies). La migración de los estándares no radiactivos se determinó por sombreado UV. La identidad de los nucleósido-3',5'-difosfatos se confirmó por co-migración de los productos de digestión con T2 con estándares preparados por ³²P-fosforilación en 5' de nucleósido-3'-monofosfatos comerciales utilizando γ -³²P-ATP y polinucleótido-quinasa T4 (datos no presentados).

1.2 Resultados y Discusión

50 1.2.1 Requerimientos de Longitud para Procesamiento de dsRNA en fragmentos de RNA de 21 y 22 nt

Un lisado preparado a partir de embriones sincitiales de *D. melanogaster* recapitula la RNAi in vitro proporcionando un nuevo instrumento para análisis bioquímico del mecanismo de la RNAi (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). El análisis in vitro e in vivo de los requerimientos de longitud de dsRNA para RNAi ha revelado que dsRNA cortos (< 150 pb) son menos efectivos que los dsRNAs más largos en la degradación del mRNA diana (Caplen et al., 2000; Hammond et al., 2000; Ngo et al., 1998; Tuschl et al., 1999). Las razones para la reducción en la eficiencia de degradación del mRNA no se conocen. Por esta razón, los autores de la invención examinaron el requerimiento preciso de longitud del dsRNA para degradación del RNA diana en condiciones optimizadas en el lisado de *Drosophila* (Zamore et al., 2000). Se sintetizaron varias series de dsRNAs y se direccionaron contra RNA informador

de luciferasa de luciérnaga (Pp-luc). La supresión específica de la expresión del RNA diana se monitorizó por el ensayo dual de luciferasa (Tuschl et al., 1999) (Figuras 1A y 1B). Se detectó la inhibición específica de la expresión de RNA diana para dsRNAs tan cortos como 38 pb, pero los dsRNAs de 29 a 36 pb no eran eficaces en este proceso. El efecto era independiente de la posición de la diana y el grado de inhibición de la expresión del mRNA Pp-luc estaba correlacionado con la longitud del dsRNA, es decir los dsRNAs largos eran más eficaces que los dsRNAs cortos.

Se ha sugerido que los fragmentos de RNA de 21-23 nt generados por procesamiento de dsRNAs son los mediadores de la interferencia del RNA y la co-supresión (Hamilton y Baulcombe, 1999; Hammod et al., 2000; Zamore et al., 2000). Por esta razón se analizó la tasa de formación de fragmentos de 21-23 nt para un subconjunto de dsRNAs de tamaños comprendidos entre 501 y 29 pb. La formación de fragmentos de 21-23 nt en lisado de *Drosophila* (Figura 2) era fácilmente detectable para dsRNAs de longitud comprendida entre 39 y 501 pb, pero se retardaba de modo significativo para el dsRNA de 29 pb. Esta observación es coherente con un papel de los fragmentos de 21-23 nt en el guiamiento de la escisión del mRNA y proporciona una explicación para la ausencia de RNAi en los dsRNAs de 30 pb. La dependencia de la longitud de la formación de 21-23 meros refleja probablemente un mecanismo de control biológicamente relevante para evitar la activación indeseada de RNAi por las estructuras intermoleculares cortas apareadas en bases de los RNAs celulares regulares.

1.2.2 El dsRNA de 39 pb Media la Escisión del RNA Diana en un Solo Sitio

La adición de dsRNA y RNA diana con casquete 5' al lisado de *Drosophila* da como resultado la degradación específica de la secuencia del RNA diana (Tuschl et al., 1999). El mRNA diana se escinde sólo dentro de la región de identidad con el dsRNA y muchos de los sitios de escisión diana estaban separados por 21-23 nt (Zamore et al., 2000). Por ello, se esperaba que el número de sitios de escisión para un dsRNA dado correspondiera grosso modo a la longitud del dsRNA dividida por 21. Se mapearon los sitios de escisión diana en un RNA diana sentido y uno antisentido que estaba radiomarcado con casquete en 5' (Zamore et al., 2000) (Figuras 3A y 3B). Los productos de escisión 5' estables se separaron en un gel de secuenciación y la posición de escisión se determinó por comparación con una RNasa T1 parcial y una escalera de hidrólisis alcalina del RNA diana.

En coherencia con la observación previa (Zamore et al., 2000), todos los sitios de escisión del RNA diana estaban localizados dentro de la región de identidad con el dsRNA. La diana sentido o antisentido era escindida sólo una vez por dsRNA de 39 pb. Cada sitio de escisión estaba localizado a 10 nt del extremo 5' de la región cubierta por el dsRNA (Figura 3B). El dsRNA de 52 pb, que comparte el mismo extremo 5' con el dsRNA de 39 pb, produce el mismo sitio de escisión en la diana sentido, localizado a 10 nt del extremo 5' de la región de identidad con el dsRNA, además de dos sitios de escisión más débiles 23 y 24 nt aguas abajo del primer sitio. La diana antisentido se escindía sólo una vez, de nuevo a 10 nt del extremo 5' de la región cubierta por dsRNA respectivo. El mapeado de los sitios de escisión para los dsRNAs de 38 a 49 pb que se muestra en la Figura 1 indicaba que el sitio de escisión primero y predominante estaba localizado siempre 7 a 10 nt aguas abajo de la región cubierta por el dsRNA (datos no presentados). Esto sugiere que el punto de escisión del RNA diana está determinado por el extremo del dsRNA y podría implicar que el procesamiento a 21-23 meros comienza desde los extremos del dúplex.

Los sitios de escisión en la diana sentido y antisentido para el dsRNA más largo de 111 pb eran mucho más frecuentes que lo anticipado y la mayoría de ellos aparecen en agrupaciones separadas por 20 a 23 nt (Figuras 3A y 3B). Como en el caso de los dsRNA más cortos, el primer sitio de escisión en la diana sentido está a 10 nt del extremo 5' de la región abarcada por el dsRNA, y el primer sitio de escisión en la diana antisentido está localizado a 9 nt del extremo 5' de la región cubierta por el dsRNA. No está claro cuál pueda ser la causa de esta escisión desordenada, pero una posibilidad podría ser que los dsRNAs más largos pueden ser procesados no sólo desde los extremos sino también internamente, o que existan algunos determinantes de especificidad para el procesamiento del dsRNA que no se conocen todavía. Algunas irregularidades respecto al espaciamiento de 21-23 nt se observaron también previamente (Zamore et al., 2000). Para conocer mejor la base molecular del procesamiento del dsRNA y el reconocimiento del RNA diana, los autores de la invención decidieron analizar las secuencias de los fragmentos de 21-23 nt generados por procesamiento de dsRNAs de 39, 52, y 111 pb en el lisado de *Drosophila*.

1.2.3 El dsRNA se Procesa a RNAs de 21 y 22 nt por un Mecanismo Semejante a RNasa III

Con objeto de caracterizar los fragmentos de RNA de 21-23 nt, se examinaron los términos 5' y 3' de los fragmentos de RNA. La oxidación con peryodato de RNAs de 21-23 nt purificados del gel, seguida por β -eliminación indicaba la presencia de grupos hidroxilo 2' y 3' terminales. Los 21-23 meros eran sensibles también al tratamiento con fosfatasa alcalina, lo que indicaba la presencia de un grupo fosfato 5' terminal. La presencia de términos 5' fosfato y 3' hidroxilo sugiere que el dsRNA podría ser procesado por una actividad enzimática similar a la RNasa III de *E. coli* (para revisiones, véase (Dunn, 1982; Nicholson, 1999; Robertson, 1990; Robertson, 1982)).

La clonación direccional de fragmentos de RNA de 21-23 nt se realizó por ligación de un oligonucleótido adaptador 3' y 5' a los 21-23 meros purificados utilizando RNA-ligasa T4. Los productos de ligación se sometieron a transcripción inversa, se amplificaron por PCR, se concatemerizaron, clonaron, y secuenciaron. Se secuenciaron más de 220 RNAs cortos a partir de reacciones de procesamiento del dsRNA de los dsRNAs de 39, 52 y 111 pb (Figura 4A). Se encontró la distribución de longitudes siguiente: 1% 18 nt, 5% 19 nt, 12% 20 nt, 45% 21 nt, 28% 22 nt, 6% 23 nt, y

2% 24 nt. El análisis de secuencia del nucleótido 5' terminal de los fragmentos procesados indicaba que los oligonucleótidos con una guanosina 5' estaban infrarrepresentados. Este sesgo era introducido muy probablemente por la RNA-ligasa T4 que discrimina contra la guanosina fosforilada en 5' como oligonucleótido donante; no se observó sesgo significativo alguno de la secuencia en el extremo 3'. Muchos de los fragmentos de ~ 21 nt derivados de los extremos 3' de la cadena sentido o antisentido de los dúplex incluyen nucleótidos 3' que se derivan de la adición sin molde de nucleótidos durante la síntesis del RNA utilizando RNA-polimerasa T7. Resulta interesante que un número significativo de RNAs endógenos de *Drosophila* de ~ 21 nt se clonaban también, algunos de ellos de retrotransposones LTR y distintos de LTR (datos no presentados). Esto es coherente con un posible papel para la RNAi en la silenciamiento de transposones.

Los RNAs de ~ 21 nt aparecen en grupos arracimados (Figura 4A) que cubren las secuencias de dsRNA enteras. Aparentemente, la reacción de procesamiento corta el dsRNA dejando extremos 3' cohesivos, otra característica de la escisión por RNasa III. Para el dsRNA de 39 pb, se encontraron dos agrupaciones de RNAs de ~ 21 nt procedentes de cada cadena constitutiva del dsRNA que incluían extremos colgantes 3', pero se detectó un solo sitio de escisión en la diana sentido y antisentido (Figuras 3A y 3B). Si los fragmentos de ~ 21 nt estaban presentes como RNAs guía monocatenarios en un complejo que media la degradación del mRNA, podría suponerse que existen al menos dos sitios de escisión diana, pero éste no era el caso. Esto sugiere que los RNAs de ~ 21 nt pueden estar presentes en forma bicatenaria en el complejo de endonucleasas, pero que sólo puede utilizarse una de las cadenas para reconocimiento y escisión del RNA diana. El uso de una sola de las cadenas de ~ 21 nt para la escisión de la diana puede estar determinado simplemente por la orientación en la cual el dúplex de ~ 21 nt está unido al complejo de nucleasas. Esta orientación está definida por la dirección en la que se procesaba el dsRNA original.

Las agrupaciones de ~ 21 meros para el dsRNA de 52 pb y 111 pb están peor definidas cuando se comparan con el dsRNA de 30 pb. Las agrupaciones se extienden sobre regiones de 25 a 30 nt que representan muy probablemente varias subpoblaciones distintas de dúplex de ~ 21 nt y que por consiguiente guían la escisión de la diana en varios sitios próximos. Estas regiones de escisión están separadas todavía predominantemente por intervalos de 20 a 23 nt. Las reglas que determinan de qué modo puede procesarse el dsRNA regular en fragmentos de ~ 21 nt no se conocen todavía, pero se observó previamente que el espaciamiento de aprox. 21-23 nt de los sitios de escisión podría estar alterado por un tramo de uridinas (Zamore et al., 2000). La especificidad de escisión del dsRNA por la RNasa III de *E. coli* parece estar controlada principalmente por antideterminantes, es decir que excluye algunos pares de bases específicos en posiciones dadas con relación al sitio de escisión (Zhang y Nicholson, 1997).

Para testar si estaba presente modificación en el azúcar, la base o el casquete en los fragmentos de RNA procesados de ~ 21 nt, se incubó dsRNA Pp-luc de 505 pb radiomarcado en lisado durante 1 hora, se aislaron los productos de ~ 21 nt, y se digirió el mismo con nucleasa P1 o T2 a mononucleótidos. La mixtura de nucleótidos se analizó luego por cromatografía 2D en capa fina (Figura 4B). Ninguno de los cuatro ribonucleótidos naturales estaba modificado como se indicaba por digestión con P1 o T2. Se ha analizado previamente la conversión de adenosina en inosina en los fragmentos de ~ 21 nt (después de una incubación de 2 horas) y se detectó una desaminación de pequeña extensión (< 0,7%) (Zamore et al., 2000); una incubación más corta en el lisado (1 h) reducía esta fracción de inosina a niveles apenas detectables. La RNasa T2, que escinde 3' del enlace fosfodiéster, producía nucleósido-3'-fosfato y nucleósido-3',5'-difosfato, indicando con ello la presencia de un monofosfato 5'-terminal. Se detectaron los cuatro nucleósido-3',5'-difosfatos, lo que sugiere que el enlace internucleotídico se escindía con poca o ninguna especificidad de secuencia. Como resumen, los fragmentos de ~ 21 nt no están modificados, y se generaban a partir del dsRNA de tal modo que estaban presentes 5'-monofosfatos y 3'-hidroxilos en el extremo 5'.

1.2.4 Los RNAs Sintéticos de 21 y 22 nt Median la Escisión del RNA Diana

El análisis de los productos de procesamiento del dsRNA indicaba que los fragmentos de ~ 21 nt se generan por una reacción con todas las características de una reacción de escisión por RNasa III (Dunn, 1982; Nicholson, 1999; Robertson, 1990; Robertson, 1982). La RNasa III realiza dos cortes escalonados en ambas cadenas del dsRNA, dejando un colgante 3' de aproximadamente 2 nt. Se sintetizaron químicamente RNAs de 21 y 22 nt, idénticos en secuencia a algunos de los fragmentos clonados de ~ 21 nt, y se testaron los mismos respecto a su capacidad para mediar la degradación del RNA diana (Figuras 5A y 5B). Los dúplex de RNA de 21 y 22 nt se incubaron a concentraciones de 100 nM en el lisado, y una concentración 10 veces mayor que la del dsRNA de control de 52 pb. En estas condiciones, la escisión del RNA diana es fácilmente detectable. La reducción de la concentración de los dúplex de 21 y 22 nt desde 100 a 10 nM causa todavía la escisión del RNA diana. En cambio, el aumento de la concentración del dúplex desde 100 nM a 1000 nM no aumenta adicionalmente la escisión de la diana, debido probablemente a un factor proteínico limitante en el lisado.

En contraste con los dsRNAs de 29 ó 30 pb que no mediaban la RNAi, los dsRNAs de 21 y 22 nt con extremos 3' colgantes de 2 a 4 nt mediaban una degradación eficiente del RNA diana (dúplex 1, 3, 4, 6, Figuras 5A y 5B). Los dsRNAs de 21 ó 22 nt con extremos romos (dúplex 2, 5, y 7, Figuras 5A y 5B) estaban reducidos en su capacidad para degradar la diana e indican que los extremos colgantes 3' son críticos para la reconstitución del complejo RNA-proteína-nucleasa. Los colgantes monocatenarios pueden requerirse para afinidad alta de fijación del dúplex de ~ 21 nt a los componentes proteínicos. Un fosfato 5' terminal, aunque presente después del procesamiento del dsRNA, no era necesario para mediar la escisión del RNA diana, y estaba ausente de los RNAs sintéticos cortos.

Los dúplex sintéticos de 21 y 22 nt guiaban la escisión tanto de las dianas sentido como de las antisentido dentro de la región cubierta por el dúplex corto. Esto es un resultado importante, considerando que un dsRNA de 39 pb, que forma dos pares de agrupaciones de fragmentos de ~ 21 nt (Fig. 2), escindía la diana sentido o antisentido una sola vez y no dos veces. Los autores de la invención interpretan este resultado sugiriendo que sólo una de las dos cadenas presentes en el dúplex de ~ 21 nt es capaz de guiar la escisión del RNA diana, y que la orientación del dúplex de ~ 21 nt en el complejo de nucleasas está determinada por la dirección inicial de procesamiento del dsRNA. La presentación de un dúplex de ~ 21 nt ya perfectamente procesado al sistema in vitro, sin embargo, hace posible la formación del complejo de nucleasas activo específico de la secuencia con dos posibles orientaciones del dúplex de RNA simétrico. Esto da como resultado la escisión tanto de la diana sentido como de la antisentido dentro de la región de identidad con el dúplex de RNA de 21 nt.

El sitio de escisión de la diana está localizado 11 ó 12 nt aguas abajo del primer nucleótido que es complementario a la secuencia guía de 21 ó 22 nt, es decir el sitio de escisión está próximo al centro de la región cubierta por los RNAs de 21 ó 22 nt (Figuras 4A y 4B). El desplazamiento de la cadena sentido de un dúplex de 22 nt por dos nucleótidos (compárense los dúplex 1 y 3 en la Figura 5A) desplazaba el sitio de escisión sólo de la cadena antisentido por dos nucleótidos. El desplazamiento de ambas cadenas sentido y antisentido por dos nucleótidos desplazaba ambos sitios de escisión por dos nucleótidos (compárense los dúplex 1 y 4). Se predice que será posible diseñar un par de RNAs de 21 ó 22 nt para escindir un RNA diana prácticamente en cualquier posición dada.

La especificidad de escisión del RNA diana guiada por RNAs de 21 y 22 nt parece perfecta, dado que no se detecta sitio de escisión aberrante alguno (Figura 5B). No obstante, debe observarse que los nucleótidos presentes en el colgante 3' del dúplex de RNA de 21 y 22 nt pueden contribuir menos al reconocimiento del sustrato que los nucleótidos próximos al sitio de escisión. Esto está basado en la observación de que el nucleótido más próximo a 3' en el colgante 3' de los dúplex activos 1 ó 3 (Figura 5A) no es complementario a la diana. Un análisis detallado de la especificidad de la RNAi puede realizarse ahora fácilmente utilizando RNAs sintéticos de 21 y 22 nt.

Basándose en la evidencia de que los RNAs sintéticos de 21 y 22 nt con extremos 3' colgantes median la interferencia del RNA, los autores de la invención proponen denominar los RNAs de ~ 21 nt "RNAs de interferencia cortos" o siRNAs y el complejo RNA-proteína respectivo como "partícula de ribonucleoproteína de interferencia pequeña" o siRNP.

1.2.5 Los colgantes 3' de 20 nt en los dsRNAs cortos inhiben la RNAi

Se ha demostrado que los dsRNAs cortos con extremos romos parecen procesarse a partir de los extremos del dsRNA. Durante el estudio realizado por los autores de la invención de la dependencia respecto a la longitud del dsRNA en la RNAi, se han analizado también dsRNAs con extremos 3' colgantes de 17 a 20 nt y se ha encontrado, sorprendentemente, que éstos eran menos potentes que los dsRNAs con extremos romos. El efecto inhibitorio de los extremos 3' largos era particularmente pronunciado para dsRNAs de hasta 100 pb, pero era menos espectacular para dsRNAs más largos. El efecto no se debía a la formación de dsRNA imperfecta basada en el análisis de gel nativo (datos no presentados). Se testó si el efecto inhibitorio de los extremos 3' colgantes largos podría utilizarse como instrumento para dirigir el procesamiento del dsRNA a sólo uno de los dos extremos de un dúplex de RNA corto.

Se sintetizaron cuatro combinaciones del dsRNA modelo de 52 pb, con extremos romos, extensión 3' sólo en la cadena sentido, extensión 3' sólo en la cadena antisentido, y extensión 3' doble en ambas cadenas, y se mapearon los sitios de escisión del RNA diana después de incubación en lisado (Figura 6A y 6B). El primer y predominante sitio de escisión de la cadena sentido se perdía cuando se extendió el extremo 3' de la cadena antisentido del dúplex, y viceversa, perdiéndose el sitio de escisión fuerte de la diana antisentido cuando se extendía el extremo 3' de la cadena sentido del dúplex. Las extensiones 3' de ambas cadenas hacían el dsRNA de 52 pb virtualmente inactivo. Una explicación para la desactivación del dsRNA por las extensiones 3' de ~ 20 nt podría ser la asociación de proteínas de fijación del RNA bicatenario que podrían interferir con la asociación de uno de los factores de procesamiento del dsRNA en este extremo. Este resultado es coherente también con el modelo de los autores de la invención en el que una sola de las cadenas del dúplex de siRNA en la siRNP ensamblada es capaz de guiar la escisión del RNA. La orientación de la cadena que guía la escisión del RNA está definida por la dirección de la reacción de procesamiento del dsRNA. Es probable que la presencia de extremos 3' cohesivos pueda facilitar el ensamblaje del complejo de procesamiento. Un bloqueo en el extremo 3' de la cadena sentido permitirá únicamente el procesamiento del dsRNA desde el extremo 3' opuesto de la cadena antisentido. Esto genera a su vez complejos de siRNP en los cuales únicamente la cadena antisentido del dúplex siRNA es capaz de guiar la escisión del RNA de la diana sentido. Esto mismo es cierto para la situación recíproca.

El efecto inhibitorio menos pronunciado de las extensiones 3' largas en el caso de dsRNAs más largos (≥ 500 pb, datos no presentados) sugiere a los autores de la invención que los dsRNAs largos pueden contener también señales de procesamiento internas del dsRNA o pueden llegar a ser procesados cooperativamente debido a la asociación de factores de escisión múltiples.

1.2.6 Un modelo para la Escisión de mRNA Dirigida por dsRNA

Los nuevos datos bioquímicos actualizan el modelo respecto al modo en que el dsRNA direcciona el mRNA para destrucción (Figura 7). El RNA bicatenario se procesa primeramente a dúplex de RNA cortos de predominantemente 21 y 22 nt de longitud y con extremos 3' cohesivos similares a una reacción de tipo RNasa III (Dunn, 1982; Nicholson, 1999; Robertson, 1982). Basándose en la longitud de 21-23 nt de los fragmentos de RNA procesados, se ha especulado ya que una actividad de tipo RNasa III puede estar implicada en la RNAi (Bass, 2000). Esta hipótesis se ve respaldada adicionalmente por la presencia de 5' fosfatos y 3' hidroxilos en los términos de los siRNAs como se observa en los productos de reacción de la RNasa III (Dunn, 1982; Nicholson, 1999). Se ha demostrado que la RNasa III bacteriana y los homólogos eucariotas Rnt1p en *S. cerevisiae* y Pac1p en *S. pombe* funcionan en el procesamiento del RNA ribosómico así como de snRNA y snoRNAs (véase por ejemplo Chanfreau et al., 2000).

Se sabe poco acerca de la bioquímica de los homólogos de RNasa III de plantas, animales o humanos. Se han identificado dos familias de enzimas RNasa III predominantemente por análisis de secuencia guiado por bases de datos o clonación de cDNAs. La primera familia de RNasa III está representada por la proteína drosha de 1327 aminoácidos de longitud de *D. melanogaster* (Acc. AF116572). El término C está compuesto de dos dominios de RNasa III y un dominio de fijación de dsRNA, y el término N tiene una función desconocida. Homólogos próximos se encuentran también en *C. elegans* (Acc. AF160248) y en humanos (Acc. AF189011) (Filippov et al., 2000; Wu et al., 2000). La RNasa III humana semejante a drosha ha sido clonada y caracterizada recientemente (Wu et al., 2000). El gen se expresa ubicuamente en tejidos y líneas de células humanos, y la proteína está localizada en el núcleo y el nucléolo de la célula. Basándose en resultados inferidos de estudios de inhibición antisentido, se sugirió un papel de esta proteína para el procesamiento del rRNA. La segunda clase está representada por el gen de *C. elegans* K12H4.8 (Acc. S44849) que codifica una proteína de 1822 aminoácidos de longitud. Esta proteína tiene un motivo N-terminal de RNA-helicasa que está seguido por dos dominios catalíticos de RNasa III y un motivo de fijación de dsRNA, similar a la familia drosha de RNasa III. Existen homólogos próximos en *S. pombe* (Acc. Q09884), *A. thaliana* (Acc. AF187317), *D. melanogaster* (Acc. AE003740), y humanos (Acc. AB028449) (Filippov et al., 2000; Jacobsen et al., 1999; Matsuda et al., 2000). Posiblemente, la RNasa III/helicasa K12H4.8 es el candidato más probable que esté implicado en la RNAi.

Cribados genéticos en *C. elegans* identificaron *rde-1* y *rde-4* como esenciales para la activación de RNAi sin un efecto sobre la movilización de transposones o la co-supresión (Dernburg et al., 2000; Grishok et al., 2000; Ketting y Plasterk, 2000; Tabara et al., 1999). Esto condujo a la hipótesis de que estos genes son importantes para el procesamiento del dsRNA pero no están implicados en la degradación de la diana mRNA. La función de ambos genes se desconoce todavía; el producto del gen *rde-1* es un miembro de una familia de proteínas similares a la proteína de conejo eIF2C (Tabara et al., 1999), y la secuencia de *rde-4* no ha sido descrita todavía. La caracterización bioquímica futura de estas proteínas debería revelar su función molecular.

El procesamiento de los dúplex de siRNA parece comenzar desde los extremos de ambos dsRNAs con extremos romos o dsRNAs con colgantes 3' cortos (1-5 nt), y procede en pasos de aproximadamente 21-23 nt. Los extremos cohesivos 3' largos (~ 20 nt) en los dsRNAs cortos suprimen la RNAi, posiblemente por interacción con proteínas de fijación de RNA monocatenario. La supresión de RNAi por regiones monocatenarias que flanquean dsRNA corto y la ausencia de formación de siRNA por los dsRNAs cortos de 30 pb pueden explicar por qué las regiones estructuradas encontradas frecuentemente en mRNAs no conducen a activación de la RNAi.

Sin pretender quedar ligados por la teoría, se presume que las proteínas de procesamiento del dsRNA o un subconjunto de éstas permanecen asociadas con el dúplex de siRNA después de la reacción de procesamiento. La orientación del dúplex de siRNA con relación a estas proteínas determina cuál de las dos cadenas complementarias funciona en el guiamiento de la degradación del RNA diana. Los dúplex del siRNA sintetizados químicamente guían la escisión tanto del RNA diana sentido como del antisentido dado que son capaces de asociarse con los componentes proteínicos en cualquiera de las dos orientaciones posibles.

El descubrimiento notable de que los dúplex sintéticos de siRNA de 21 y 22 nt pueden utilizarse para degradación eficiente del mRNA proporciona nuevos instrumentos para regulación específica de la secuencia de la expresión génica en genómica funcional así como en estudios biomédicos. Los siRNAs pueden ser eficaces en sistemas de mamífero donde no pueden utilizarse dsRNAs largos debido a la activación de la respuesta de PKR (Clemens, 1997). Como tales, los dúplex de siRNA representan una nueva alternativa a las terapéuticas antisentido o de ribozimas.

Ejemplo 2

Interferencia de RNA en Cultivos de Tejido Humanos

2.1 Métodos

2.1.1 Preparación del RNA

Se sintetizaron químicamente RNAs de 21 nt utilizando fosforamiditos RNA Expedite y timidina-fosforamidito (Prologo, Alemania). Los oligonucleótidos sintéticos se desprotegeron y purificaron del gel (Ejemplo 1), seguido por purificación en cartucho Sep-Pak C18 (Waers, Milford, MA, EE.UU.) (Tuschl, 1993). Las secuencias de siRNA que

- direccionaban GL2 (Acc. X65324) y GL3 luciferasa (Acc. U47296) correspondían a las regiones codificantes 153-173 con relación al primer nucleótido del codón de inicio, siRNAs que direccionaban RL (Acc. AF025846) correspondían a la región 119-129 después del codón inicial. Los RNAs más largos se transcribieron con RNA-polimerasa T7 a partir de productos PCR, seguido por purificación en gel y Sep-Pak. Los dsRNAs GL2 o GL3 de 49 y 484 pb correspondían a las posiciones 113-161 y 113-596, respectivamente, con relación al comienzo de la traducción; los dsRNAs RL de 50 y 501 pb correspondían a las posiciones 118-167 y 118-618, respectivamente. Los moldes PCR para la síntesis de dsRNA que direccionaba GFP humanizado (hG) se amplificaron a partir de pAD3 (Kehlenbach, 1998), donde el dsRNA hG de 50 y 501 pb correspondía a las posiciones 118-167 y 118-618, respectivamente, al codón de inicio.
- 10 Para la reasociación de siRNAs, se incubaron cadenas simples 20 μ M en tampón de reasociación (acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM a pH 7,4, acetato de magnesio 2 mM) durante 1 min a 90°C seguido por 1 hora a 37°C. El paso de incubación a 37°C se prolongó durante una noche para los dsRNAs de 50 y 500 pb y estas reacciones de reasociación se llevaron a cabo a concentraciones de cadena 8,4 μ M y 0,84 μ M, respectivamente.

2.1.2 Cultivo de Células

- 15 Se propagaron células Schneider S2 en medio de *Drosophila* (Life Technologies) suplementado con 10% FBS, 100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina a 25°C. Se dejaron crecer células 293, NIH/3T3, HeLa S3, y COS-7 a 37°C en medio de Eagle modificado de Dulbecco, suplementado con 10% FBS, 100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina. Las células se sometieron regularmente a pases para mantener crecimiento exponencial. Veinticuatro horas antes de la transfección a aproximadamente 80% de confluencia, se tripsinizaron células de mamífero y se diluyeron 1:5 con medio reciente sin antibióticos ($1-3 \times 10^5$ células/ml) y se transfirieron a placas de 24 pocillos (500 μ l/pocillo). Las células S2 no se tripsinizaron antes de la división. La transfección se llevó a cabo con reactivo Lipofectamine 2000 (Life Technologies) como ha sido descrito por el fabricante para líneas de células adherentes. Se aplicaron por pocillo 1,0 μ g de pGL2-Control (Promega) o pGL3-Control (Promega), 0,1 μ g de pRL-TK (Promega) y 0,28 μ g de dúplex de siRNA o dsRNA, formulados en liposomas; el volumen final era 600 μ l por pocillo. Las células se incubaron 20 horas después de la transfección y parecían sanas después de ello. Se monitorizó posteriormente la expresión de luciferasa con el ensayo dual de luciferasa (Promega). Las eficiencias de transfección se determinaron por microscopía de fluorescencia para líneas de células de mamífero después de cotransfección de 1,1 μ g de pAD3 codificante de hGFP y 0,28 μ g de siRNA invGL2 inGL2 y eran 70-90%. Los plásmidos informadores se amplificaron en XL-1 Blue (Stratagene) y se purificaron utilizando el Kit EndoFree Maxi Plasmid de Qiagen.

2.2 Resultados y Discusión

- Para testar si los siRNAs son capaces también de mediar la RNAi en cultivo de tejidos, se sintetizaron dúplex de siRNA de 21 nt con colgantes 3' simétricos de 2 nt dirigidos contra genes informadores que codificaban el pensamiento de mar (*Renilla reniformis*) y dos variantes de secuencia de luciferasas de luciérnaga (*Photinus pyralis* GL2 y GL3) (Fig. 8a, b). Los dúplex de siRNA se co-transfectaron con las condiciones de plásmidos informadores pGL2/pRL o pGL3/pRL en células Schneider S2 de *D. melanogaster* o células de mamífero utilizando liposomas catiónicos. Las actividades de luciferasa se determinaron 20 horas después de la transfección. En todas las líneas de células testadas, se observó una reducción específica de la expresión de los genes informadores en presencia de dúplex de siRNA emparentados (Fig. 9a-j). Era notable que los niveles absolutos de expresión de luciferasa no se veían afectados por los siRNAs no emparentados, lo que indicaba la ausencia de efectos secundarios nocivos de los dúplex de RNA de 21 nt (v.g. Fig. 10a-d para células HeLa). En las células S2 de *D. melanogaster* (Fig. 9a, b), la inhibición específica de las luciferasas era completa. En células de mamífero, donde los genes informadores se expresaban con intensidad 50 a 100 veces mayor, la supresión específica era menos completa (Fig. 9c-j). La expresión de GL2 se reducía de 3 a 12 veces, la expresión de GL3 de 9 a 25 veces, y la expresión de RL 1 a 3 veces, en respuesta a los siRNAs emparentados. Para las células 293, el direccionamiento de luciferasa RL por los siRNAs RL era ineficaz, aunque las dianas GL2 y GL3 respondían específicamente (Fig. 9i, j). La ausencia de reducción de la expresión de RL en las células 293 puede ser debida a su expresión 5 a 20 veces mayor comparada con cualquier otra línea de células de mamífero testada y/o a la accesibilidad limitada de la secuencia diana debido a la estructura secundaria del RNA o las proteínas asociadas. Sin embargo, el direccionamiento específico de luciferasa GL2 y GL3 por los dúplex de siRNA emparentados indicaba que la RNAi funciona también en las células 293.

- El colgante 3' de 2 nt en todos los dúplex de siRNA, excepto en uGL2, estaba compuesto de (2'-desoxi)-timidina. La sustitución de uridina por timidina en el colgante 3' era bien tolerada en el sistema de *D. melanogaster* in vitro, y la secuencia del colgante no era crítica para el reconocimiento de la diana. Se seleccionó el colgante de timidina debido a que se supone que el mismo aumenta la resistencia a las nucleasas de los siRNAs en medio de cultivo de tejido y dentro de las células transfectadas. De hecho, el siRNA GL2 modificado con timidina era ligeramente más potente que el siRNA uGL2 no modificado en todas las líneas de células testadas (Fig. 9a, c, e, g, i). Es imaginable que modificaciones ulteriores de los nucleótidos con colgante 3' puedan proporcionar beneficios adicionales a la administración y estabilidad de los dúplex de siRNA.

- En experimentos de co-transfección, se utilizaron dúplex de siRNA 25 nM con respecto al volumen final de medio de cultivo de tejidos (Fig. 9, 10). El aumento de la concentración de siRNA a 100 nM no mejoraba los efectos de silenciamiento específicos, pero comenzaba a afectar a las eficiencias de transfección debido a competición para la encapsulación en liposomas entre el DNA plasmídico y el siRNA (datos no presentados). La disminución de la concentración de siRNA a 1,5 nM no reducía el efecto de silenciamiento específico (datos no presentados), aun cuando los siRNAs eran ahora sólo 2 a 20 veces más concentrados que los plásmidos de DNA. Esto indica que los siRNAs son reactivos extraordinariamente potentes para mediación de la silenciamiento de genes y que los siRNAs son eficaces a concentraciones que son varios órdenes de magnitud inferiores a las concentraciones aplicadas en los experimentos convencionales de direccionamiento de genes antisentido o de ribozimas.
- Con objeto de monitorizar el efecto de dsRNAs más largos en células de mamífero, se prepararon dsRNAs de 50 y 500 pb emparentados con los genes informadores. Como control inespecífico, se utilizaron dsRNAs de GFP humanizado (hG) (Kehlenbach, 1998). Cuando se cotransfectaron los dsRNAs, en cantidades (no concentraciones) idénticas a los dúplex de siRNA, la expresión del gen informador se reducía fuerte e inespecíficamente. Este efecto se ilustra para células HeLa como ejemplo representativo (Fig. 10a-d). Las actividades absolutas de luciferasa se reducían inespecíficamente de 10 a 20 veces por dsRNA de 50 pb y 20 a 200 veces por cotransfección con dsRNA de 500 pb, respectivamente. Se observaron efectos inespecíficos similares para células COS-7 y NIH/3T3. Para las células 293, se observó una reducción inespecífica de 10 a 20 veces únicamente para los dsRNAs de 500 pb. Una reducción inespecífica en la expresión de genes informadores por dsRNA > 30 pb era esperada como parte de la respuesta de interferón.
- Sorprendentemente, a pesar de la fuerte disminución inespecífica en la expresión de genes informadores, se detectaba de manera reproducible una silenciamiento adicional mediada por dsRNA y específica de la secuencia. Los efectos de silenciamiento específicos, sin embargo, se apreciaban sólo cuando las actividades relativas de los genes informadores se normalizaron a los controles de dsRNA hG (Fig. 10e, f). Se observaba también una reducción específica de 2 a 10 veces en respuesta a dsRNA emparentado en las otras tres líneas de células de mamífero testadas (datos no presentados). Efectos de silenciamiento específicos con dsRNAs (356-1662 pb) se consignaron previamente en células CHO-K1, pero las cantidades de dsRNA requeridas para detectar una reducción específica de 2 a 4 veces eran aproximadamente 20 veces mayores que en los experimentos realizados por los autores de la invención (Ui-Tei, 2000). Asimismo, las células CHO-K1 parecen ser deficientes en la respuesta de interferón. En otro informe, se testaron células 293, NIH/3T3 y BHK-21 respecto a RNAi utilizando combinaciones luciferasa/informador lacZ y dsRNA lacZ específico de 829 pb o GFP inespecífico de 717 pb (Caplen, 2000). El fallo en la detección de RNAi en este caso puede ser debido al ensayo menos sensible luciferasa/informador lacZ y a las diferencias de longitud del dsRNA diana y de control. Consignados en su conjunto, los resultados de los autores de la invención indican que la RNAi es activa en células de mamífero, pero que el efecto de silenciamiento es difícil de detectar si el sistema de interferón está activado por dsRNA > 30 pb.
- En suma, se ha demostrado por primera vez la silenciamiento de genes mediada por siRNA en células de mamífero. El uso de siRNAs cortos sigue siendo prometedor para la desactivación de la función de genes en cultivo de tejidos humanos y el desarrollo de terapéuticas génicas específicas.

Ejemplo 3

Inhibición Específica de la Expresión de Genes por la Interferencia de RNA

3.1 Materiales y Métodos

3.1.1 Preparación del RNA y Ensayo de RNAi

La síntesis química del RNA, reasociación, y ensayos de RNAi basados en luciferasa se realizaron como se describe en los Ejemplos 1 ó 2 o en publicaciones previas. (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). Todos los dúplex de siRNA se direccionaron contra luciferasa de luciérnaga, y la secuencia de mRNA de luciferasa se derivó a partir de pGEM-luc (acceso a GenBank X65316) como se ha descrito (Tuschl et al., 1999). Los dúplex de siRNA se incubaron en la reacción de RNAi/traducción en *D. melanogaster* durante 15 min antes de la adición de mRNAs. Los ensayos de RNAi basados en traducción se realizaron al menos por triplicado.

Para mapeado de la escisión del RNA diana sentido, se generó un transcrito de 117 nt, correspondiente a la secuencia de luciferasa de luciérnaga entre las posiciones 113 y 273 con relación al codón de inicio, seguido por el complemento de 17 nt de la secuencia promotora SP6. Para mapeado de la escisión del RNA diana antisentido, se produjo un transcrito de 166 nt a partir de un molde, que se amplificó a partir de la secuencia plasmídica por PCR utilizando el iniciador 5' TAATACGACTCACTATAGAGCCCATATCGTTTCATA (promotor T7 subrayado) y el cebador 3' AGAGGATGGAACCGCTGG. La secuencia diana corresponde al complemento de la secuencia de luciferasa de luciérnaga entre las posiciones 50 y 215 con relación al codón de inicio. Se realizó una marcación con guanilil-transferasa como se ha descrito previamente (Zamore et al., 2000). Para mapeado de la escisión del RNA diana, se incubó un dúplex de siRNA 100 nM con RNA diana 5 a 10 nM en lisado de embrión de *D. melanogaster* en condiciones estándar (Zamore et al., 2000) durante 2 horas a 25°C. La reacción se paró por la adición de 8 volúmenes de tampón de proteinasa K (Tris-HCl 200 mM de pH 7,5, EDTA 25 mM, NaCl 300 mM, 2% p/v

dodecilsulfato de sodio). Se añadió proteinasa K (E.M. Merck, disuelta en agua) a una concentración final de 0,6 mg/ml. Las reacciones se incubaron luego durante 15 min a 65°C, se extrajeron con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se precipitaron con 3 volúmenes de etanol. Las muestras se localizaron en geles de secuenciación al 6%. Se generaron estándares de longitud por digestión parcial con RNasa T1 e hidrólisis básica parcial de los RNAs diana sentido o antisentido marcados en el casquete.

3.2 Resultados

3.2.1 Variación del Colgante 3' en Dúplex de siRNAs de 21 nt

Como se ha descrito arriba, 2 ó 3 nucleótidos no apareados en el extremo 3' de dúplex de siRNA eran más eficientes en la degradación del RNA diana que los dúplex con extremos romos respectivos. Para realizar un análisis más exhaustivo de la función de los nucleótidos terminales, se sintetizaron cinco siRNAs sentido de 21 nt, desplazado cada uno en un nucleótido en relación con el RNA diana, y 8 siRNAs antisentido de 21 nt, desplazado cada uno en un nucleótido en relación con la diana (Figura 11A). Por combinación de siRNAs sentido y antisentido, se generaron ocho series de dúplex de siRNA con extremos colgantes sintéticos que cubrían un rango de colgante 3' de 7 nt a colgante 5' de 4 nt. La interferencia de los dúplex de siRNA se midió utilizando el sistema de ensayo dual de luciferasa (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). Los dúplex de siRNA estaban direccionados contra mRNA de luciferasa de luciérnaga, y se utilizó mRNA de luciferasa de pensamiento de mar como control interno. La ratio de luminiscencia de actividad de luciferasa diana a la de control se determinó en presencia de dúplex de siRNA y se normalizó a la ratio observada en ausencia de dsRNA. Para comparación, las ratios de interferencia de dsRNAs largos (39 a 504 pb) se muestran en la Figura 11B. Las ratios de interferencia se determinaron a concentraciones de 5 nM para dsRNAs largos (Figura 11A) y a 100 nM para dúplex de siRNA (Figura 11C-J). Se seleccionaron las concentraciones de 100 nM de siRNAs debido a que el procesamiento completo de 5 nM de dsRNA de 504 pb daría como resultado dúplex de siRNA totales de 120 nM.

La capacidad de los dúplex de siRNA de 21 nt para mediar la RNAi depende del número de nucleótidos colgantes o pares de bases formados. Los dúplex con 4 a 6 nucleótidos colgantes 3' eran incapaces de mediar la RNAi (Figura 11 C-F), como lo eran los dúplex con dos o más nucleótidos colgantes 5' (Figura 11G-J). Los dúplex con colgantes 3' de 2 nt eran muy eficientes en la mediación de la interferencia de RNA, aunque la eficiencia de silenciación era también dependiente de la secuencia, y se observaban diferencias de hasta 12 veces para diferentes dúplex de siRNA con colgantes 3' de 2 nt (compárense las Figuras 11D-H). Dúplex con extremos romos, colgantes 5' de 1 nt o colgantes 3' de 1 a 3 nt eran funcionales en algunos casos. El pequeño efecto de silenciación observado para el dúplex de siRNA con colgante 3' de 7 nt (Figura 11C) puede ser debido a un efecto antisentido del colgante 3' largo más bien que debido a RNAi. La comparación de la eficiencia de RNAi entre dsRNAs largos (Fig. 11B) y los dúplex de siRNA más eficaces de 21 nt (Fig. 11E, G, H) indica que un dúplex de siRNA simple a 100 nM de concentración puede ser tan eficaz como dsRNA de 504 pb 5 nM.

3.2.2 Variación de Longitud del siRNA Sentido Apareado a un siRNA Antisentido Invariante de 21 nt

Con objeto de investigar el efecto de la longitud de siRNA sobre la RNAi, se prepararon tres series de dúplex de siRNA, combinando tres cadenas antisentido de 21 nt con ocho cadenas sentido de 18 a 25 nt. El colgante 3' del siRNA antisentido se fijó a 1, 2 ó 3 nt en cada serie de dúplex de siRNA, mientras que el siRNA sentido se modificó en su extremo 3' (Figura 12A). Con independencia de la longitud del siRNA sentido, se encontró que los dúplex con colgante 3' de 2 nt de siRNA antisentido (Figura 12C) eran más activos que aquéllos que tenían un colgante 3' de 1 ó 3 nt (Figura 12B, D). En la primera serie, con colgante 3' de 1 nt de siRNA antisentido, los dúplex con siRNAs sentido de 21 y 22 nt, que llevaban un colgante 3' de 1 y 2 nt de siRNA sentido, respectivamente, eran los más activos. Los dúplex con siRNAs sentido de 19 a 25 nt eran también capaces de mediar RNA, pero en menor grado. Análogamente, en la segunda serie, con colgante de 2 nt de siRNA antisentido, el dúplex de siRNA de 21 nt con colgante 3' de 2 nt era el más activo, y cualquier otra combinación con los siRNAs sentido de 18 a 25 nt era activa en un grado significativo. En la última serie, con colgante 3' de siRNA antisentido de 3 nt, únicamente el dúplex con siRNA sentido de 20 nt y el colgante 3' sentido de 2 nt era capaz de reducir la expresión del RNA diana. En conjunto, estos resultados indican que tanto la longitud del siRNA como la longitud del colgante 3' son importantes, y que los dúplex de siRNAs de 21 nt con colgante 3' de 2 nt son óptimos para la RNAi.

3.2.3 Variación de la Longitud de los Dúplex de siRNA con un Colgante 3' Constante de 2 nt

Se examinó después el efecto del cambio simultáneo de la longitud de ambas cadenas de siRNA manteniendo colgantes 3' simétricos de 2 nt (Figura 13A). Se prepararon dos series de dúplex de siRNA que incluían el dúplex de siRNA de 21 nt de la Figura 11H como referencia. La longitud de los dúplex variaba entre 20 y 25 pb por extensión del segmento de bases apareadas en el extremo 3' del siRNA sentido (Figura 13B) o en el extremo 3' del siRNA antisentido (Figura 13C). Los dúplex de 20 a 23 pb causaban represión específica de la actividad de luciferasa diana, pero el dúplex de siRNA de 21 nt era al menos 8 veces más eficiente que cualquiera de los otros dúplex. Los dúplex de siRNA de 24 y 25 nt no daban como resultado interferencia detectable alguna. Los efectos específicos de la secuencia eran menores, dado que las variaciones en ambos extremos de dúplex producían efectos similares.

3.2.4 Dúplex de siRNA modificados con 2'-desoxi y 2'-O-metilo

Para evaluar la importancia de los residuos ribosa de siRNA para la RNAi, se examinaron dúplex con siRNAs de 21 nt y colgantes 3' de 2 nt con cadenas modificadas con 2'-desoxi o 2'-O-metilo (Figura 14). La sustitución de los colgantes 3' de 2 nt por nucleótidos 2'-desoxi no tenía efecto alguno, e incluso el reemplazamiento de dos ribonucleótidos adicionales adyacentes a los colgantes en la región apareada producía siRNAs significativamente
 5 activos. Así, se reemplazaron ocho de 42 nt de un dúplex de siRNA por residuos de DNA sin pérdida de actividad. La sustitución completa de una o ambas cadenas de siRNA por residuos 2'-desoxi, sin embargo, anulaba la RNAi, como lo hacía la sustitución por residuos 2'-O-metilo.

3.2.5 Definición de los sitios de escisión del RNA diana

Se determinaron previamente las posiciones de escisión del RNA diana para dúplex de siRNA de 22 nt y para un
 10 dúplex de 21 nt/22 nt. Se encontró que la posición de la escisión del RNA diana estaba localizada en el centro de la región cubierta por el dúplex de siRNA, 11 ó 12 nt aguas abajo del primer nucleótido que era complementario a la secuencia guía del siRNA de 21 ó 22 nt. Se incubaron cinco dúplex de siRNA de 21 nt distintos con colgante 3' de 2 nt (Figura 15A) con RNA diana sentido o antisentido marcado en el casquete 5' en lisado de *D. melanogaster* (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). Los productos de escisión 5' se resolvieron en geles de secuenciación (Figura 15B). La cantidad de RNA diana sentido escindida está correlacionada con la eficiencia de los dúplex de siRNA
 15 determinada en el ensayo basado en traducción, y los dúplex de siRNA 1, 2 y 4 (Figura 15B y 11H, G, E) escinden el RNA diana más rápidamente que los dúplex 3 y 5 (Figura 15B y 11 F, D). Es notable que la suma de radiactividad del producto de escisión 5' y el RNA diana de entrada no era constante a lo largo del tiempo, y los productos de escisión 5' no se acumulaban. Presumiblemente, los productos de escisión, una vez liberados del complejo siRNA-endonucleasa, se degradan rápidamente debido a la falta de cualquiera de la cola poli(A) del casquete 5'.
 20

Los sitios de escisión para ambos RNAs diana sentido y antisentido estaban localizados en el centro de la región abarcada por los dúplex de siRNA. Los sitios de escisión para cada diana producida por los 5 dúplex diferentes
 25 variaban en 1 nt de acuerdo con el desplazamiento de 1 nt de los dúplex a lo largo de las secuencias diana. Las dianas se escindían con precisión 11 nt aguas abajo de la posición de la diana complementaria al nucleótido más próximo a 3' del siRNA guía complementario de la secuencia (Figura 15A, B).

Con objeto de determinar, si el extremo 5' o el 3' del siRNA guía establece la pauta para la escisión del RNA diana, se ideó la estrategia experimental reseñada en la Figura 16A y B. Un siRNA antisentido de 21 nt, que se mantuvo invariable para este estudio, se apareó con siRNAs sentido que estaban modificados en cualquiera de sus extremos 5' o 3'. La posición de la escisión del RNA diana sentido y antisentido se determinó como se ha descrito arriba. Los
 30 cambios en el extremo 3' del siRNA sentido, monitorizados para colgante 5' de 1 nt a colgante 3' de 6 nt, no afectaban a la posición de escisión del RNA diana sentido ni la del antisentido (Figura 16C). Los cambios en el extremo 5' del siRNA sentido no afectaban a la escisión del RNA diana sentido (Figura 16D, panel superior), lo que era de esperar dado que el siRNA antisentido se mantenía inalterado. Sin embargo, la escisión del RNA diana antisentido se veía afectada y era fuertemente dependiente del extremo 5' del siRNA sentido (Figura 16D, panel inferior). La diana antisentido se escindía únicamente cuando el siRNA sentido tenía un tamaño de 20 ó 21 nt, y la posición de escisión era diferente en 1 nt, lo que sugería que el extremo 5' del siRNA de reconocimiento de la diana establece la pauta para escisión del RNA diana. La posición está localizada entre los nucleótidos 10 y 11 cuando se cuenta en dirección de aguas arriba desde el nucleótido diana apareado al nucleótido más próximo a 5' del siRNA guía (véase también la Figura 15A).
 35

40 3.2.6 Efectos de la secuencia y las sustituciones 2'-desoxi en el colgante 3'

Se prefiere un colgante 3' de 2 nt para la función del siRNA. Se deseaba conocer si la secuencia de los nucleótidos colgantes contribuye al reconocimiento de la diana, o si es sólo una característica requerida para reconstitución del complejo de endonucleasas (RISC o siRNP). Se sintetizaron siRNAs sentido y antisentido con colgantes 3' AA, CC, GG, UU, y UG, que incluían las modificaciones 2'-desoxi TdG y TT. Los siRNAs de tipo salvaje contenían AA en el colgante 3' sentido y UG en el colgante 3' antisentido (AA/UG). Todos los dúplex de siRNA eran funcionales en el ensayo de interferencia y reducían la expresión de la diana al menos 5 veces (Figura 17). Los dúplex de siRNA más eficientes que reducían la expresión de la diana más 10 veces, eran del tipo de secuencia NN/UG, NN/UU, NN/TdG, y NN/TT (N es cualquier nucleótido). Los dúplex de siRNA con un colgante 3' de siRNA antisentido de AA, CC o GG eran menos activos por un factor de 2 a 4 cuando se comparaban con la secuencia de tipo salvaje UG o el mutante UU. Esta reducción en la eficiencia de la RNAi se debe probablemente a la contribución del penúltimo nucleótido 3' al reconocimiento de la diana específico de la secuencia, dado que el nucleótido terminal 3' se cambiaba de G a U sin efecto alguno.
 45

Los cambios en la secuencia del colgante 3' del siRNA sentido no revelaban efecto alguno dependiente de la secuencia, lo cual era de esperar, dado que el siRNA sentido no tiene que contribuir al reconocimiento del mRNA diana sentido.
 50

55 3.2.7 Especificidad de la Secuencia de Reconocimiento de la Diana

Con objeto de examinar la especificidad de secuencia del reconocimiento de la diana, se introdujeron cambios de secuencia en los segmentos apareados de los dúplex de siRNA y se determinó la eficiencia de silenciamiento. Los

cambios de secuencia por inversión de segmentos cortos de 3 ó 4 nt de longitud o como mutaciones puntuales (Figura 18). Los cambios de secuencia en una cadena de siRNA se compensaron en la cadena de siRNA complementaria a fin de evitar la perturbación de la estructura del dúplex de siRNA apareado en bases. La secuencia de todos los colgantes 3' de 2 nt era TT (T, 2'-desoxitimidina) a fin de reducir los costes de la síntesis. El dúplex de siRNA de referencia TT/TT era comparable en RNAi al dúplex de siRNA de tipo salvaje AA/UG (Figura 17). La capacidad para mediar la destrucción del mRNA informador se cuantificó utilizando el ensayo de luminiscencia basado en traducción. Los dúplex de siRNAs con segmentos de secuencia invertidos exhibían una capacidad espectacularmente reducida para direccionamiento del informador de luciferasa de luciérnaga (Figura 18). Los cambios de secuencia localizados entre el extremo 3' y la parte media del siRNA antisentido anulaban por completo el reconocimiento del RNA diana, pero mutaciones próximas al extremo 5' del siRNA antisentido exhibían un pequeño grado de silenciamiento. La transversión del par de bases A/U localizado directamente opuesto al sitio de escisión del RNA diana predicho, o un nucleótido más alejado del sitio predicho, evitaba la escisión del RNA diana, indicando con ello que una sola mutación dentro del centro de un dúplex de siRNA discrimina entre dianas erróneamente apareadas.

15 3.3 Discusión

Los siRNAs son reactivos valiosos para desactivación de la expresión génica, no sólo en células de insecto, sino también en células de mamífero, con un gran potencial para aplicación terapéutica. Los autores de la invención han analizado sistemáticamente los determinantes estructurales de dúplex de siRNA requeridos para promover una degradación eficiente del RNA diana en lisado de embrión de *D. melanogaster*, proporcionando así reglas para el diseño de dúplex de siRNA muy potentes. Un dúplex perfecto de siRNA es capaz de silenciar la expresión génica con una eficiencia comparable a un dsRNA de 500 pb, dado que se utilizan cantidades comparables de RNA total.

20 3.4 La guía del usuario de siRNA

Los dúplex de siRNA de silenciamiento eficientes están compuestos preferiblemente de siRNAs antisentido de 21 nt, y deberían seleccionarse para formar una doble hélice de 19 pb con extremos colgantes 3' de 2 nt. Las sustituciones 2'-desoxi de los ribonucleótidos colgantes 3' de 2 nt no afectan a la RNAi, pero ayudan a reducir los costes de la síntesis de RNA y pueden aumentar la resistencia a las RNasas de los dúplex de siRNA. Sin embargo, modificaciones 2'-desoxi o 2'-O-metilo más extensas reducen la capacidad de los siRNAs para mediar la RNAi, probablemente por interferir con la asociación de las proteínas para el ensamblaje de siRNAP.

El reconocimiento de la diana es un proceso altamente específico de la secuencia, mediado por el siRNA complementario a la diana. El nucleótido más próximo a 3' del siRNA guía no contribuye a la especificidad de reconocimiento de la diana, mientras que el penúltimo nucleótido del colgante 3' afecta a la escisión del RNA diana, y un apareamiento erróneo reduce la RNAi 2 a 4 veces. El extremo 5' de un siRNA guía parece también más permisivo para el reconocimiento del RNA diana apareado erróneamente cuando se compara con el extremo 3'. Los nucleótidos en el centro del siRNA, localizados opuestamente al sitio de escisión del RNA diana, son determinantes importantes de especificidad, e incluso cambios simples de nucleótido reducen la RNAi a nivel indetectable. Esto sugiere que los dúplex de siRNA pueden ser capaces de discriminar alelos mutantes o polimórficos en experimentos de direccionamiento de genes, lo cual puede convertirse en una característica importante para desarrollos terapéuticos futuros.

Se ha sugerido que los siRNAs sentido y antisentido, cuando se asocian con los componentes proteínicos del complejo de endonucleasas o su complejo de compromiso, juegan papeles distintos; la orientación relativa del dúplex de siRNA en este complejo define qué cadena puede utilizarse para reconocimiento de la diana. Los dúplex de siRNA sintéticos tienen simetría de diana con respecto a la estructura de la doble hélice, pero no con respecto a la secuencia. La asociación de los dúplex de siRNA con las proteínas de RNAi en el lisado de *D. melanogaster* conducirá a la formación de dos complejos asimétricos. En tales complejos hipotéticos, el entorno quiral es distinto para el siRNA sentido y antisentido, de donde se deriva su función. La predicción, obviamente, no es aplicable a secuencias de siRNA palindrómicas, o a proteínas de RNAi que podrían estar asociadas como homodímeros. Para minimizar los efectos de la secuencia, que pueden afectar a la ratio de siRNPs de direccionamiento sentido y antisentido, los autores de la presente invención sugieren utilizar secuencias de siRNA con secuencias colgantes 3' idénticas. Se recomienda ajustar la secuencia del colgante del siRNA sentido a la del colgante 3' antisentido, dado que el siRNA sentido no tiene una diana en los experimentos de desactivación típicos. La asimetría en la reconstitución de los siRNPs de escisión sentido y antisentido podría ser (parcialmente) responsable de la variación en la eficiencia de la RNAi observada para diversos dúplex de siRNA de 21 nt con colgantes 3' de 2 nt utilizados en este estudio (Figura 14). Alternativamente, la secuencia de nucleótidos en el sitio diana y/o la accesibilidad de la estructura del RNA diana pueden ser responsables de la variación en eficiencia para estos dúplex de siRNA.

Referencias

Bass, B. L. (2000). Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 101, 235-238.

Bosher, J. M., and Labouesse, M. (2000). RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat. Cell Biol.* 2, E31-36.

Caplen, N. J., Fleenor, J., Fire, A., and Morgan, R. A. (2000). dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. *Gene* 252, 95-105.

Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G., and Cogoni, C. (2000). Gene silencing in worms and fungi. *Nature* 404, 245.

Chanfreau, G., Buckle, M., and Jacquier, A. (2000). Recognition of a conserved class of RNA tetraloops by *Saccharomyces cerevisiae* RNase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3142-3147.

Clemens, M. J. (1997). PKR--a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 945-949.

Cogoni, C., and Macino, G. (1999). Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 657-662.

Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., and Baulcombe, D. C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101, 543-553.

Dernburg, A. F., Zalevsky, J., Colaiacovo, M. P., and Villeneuve, A. M. (2000).

Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line. *Genes & Dev.* 14, 1578-1583.

Dunn, J. J. (1982). Ribonuclease III. In *The enzymes*, vol 15, part B, P. D. Boyer, ed. (New York: Academic Press), pp. 485-499.

Filippov, V., Solovyev, V., Filippova, M., and Gill, S. S. (2000). A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene* 245, 213-221.

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

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

Grishok, A., Tabara, H., and Mello, C. C. (2000). Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science* 287, 2494-2497.

Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.

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

Jacobsen, S. E., Running, M. P., and M., M. E. (1999). Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* 126, 5231-5243.

Jensen, S., Gassama, M. P., and Heidmann, T. (1999). Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing. *Nat. Genet.* 21, 209-212.

Kehlenbach, R. H., Dickmanns, A. & Gerace, L. (1998). Nucleocytoplasmic shuttling factors including Ran and CRM1 mediate nuclear export of NFAT In vitro. *J. Cell Biol.* 141, 863-874.

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

Ketting, R. F., Haverkamp, T. H., van Luenen, H. G., and Plasterk, R. H. (1999). Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* 99, 133-141.

Ketting, R. F., and Plasterk, R. H. (2000). A genetic link between co-suppression and RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 404, 296-298.

Lucy, A. P., Guo, H. S., Li, W. X., and Ding, S. W. (2000). Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J.* 19, 1672-1680.

Matsuda, S., Ichigotani, Y., Okuda, T., Irimura, T., Nakatsugawa, S., and Hamaguchi, M. (2000). Molecular cloning and characterization of a novel human gene (HERNA) which encodes a putative RNA-helicase. *Biochim. Biophys. Acta* 31, 1-2.

Milligan, J.F., and Uhlenbeck, O.C. (1989). Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods Enzymol.* 180, 51-62.

Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Jouette, D., Lacombe, A. M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T. A., and Vaucheret, H. (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance.

Cell 101, 533-542.

Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., and Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14687-14692.

Nicholson, A. W. (1999). Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. FEMS Microbiol. Rev. 23, 371-390.

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

Pan, T., and Uhlenbeck, O. C. (1992). In vitro selection of RNAs that undergo autolytic cleavage with Pb^{2+} . Biochemistry 31, 3887-3895.

Pelissier, T., and Wassenegger, M. (2000). A DNA target of 30 bp is sufficient for RNA-directed methylation. RNA 6, 55-65.

Plasterk, R. H., and Ketting, R. F. (2000). The silence of the genes. Curr. Opin. Genet. Dev. 10, 562-567.

Ratcliff, F. G., MacFarlane, S. A., and Baulcombe, D. C. (1999). Gene Silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. Plant Cell 11, 1207-1216.

Robertson, H. D. (1990). Escherichia coli ribonuclease III. Methods Enzymol. 181, 189-202.

Robertson, H. D. (1982). Escherichia coli ribonuclease III cleavage sites. Cell 30, 669-672.

Romaniuk, E., McLaughlin, L. W., Neilson, T., and Romaniuk, P. J. (1982). The effect of acceptor oligoribonucleotide sequence on the T4 RNA ligase reaction. *Eur J Biochem* 125, 639-643.

Sharp, P. A. (1999). RNAi and double-strand RNA. *Genes & Dev.* 13, 139-141.

Sijen, T., and Kooter, J. M. (2000). Post-transcriptional gene-silencing: RNAs on the attack or on the defense? *Bioessays* 22, 520-531.

Smardon, A., Spoerke, J., Stacey, S., Klein, M., Mackin, N., and Maine, E. (2000). EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 10, 169-178.

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

Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C. C. (1999). The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99, 123-132.

Tuschl, T., Ng, M. M., Pieken, W., Benseler, F., and Eckstein, F. (1993). Importance of exocyclic base functional groups of central core guanosines for hammerhead ribozyme activity. *Biochemistry* 32, 11658-11668.

Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (1998). Selection in vitro of novel ribozymes from a partially randomized U2 and U6 snRNA library. *EMBO J.* 17, 2637-2650.

Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P., and Sharp, P. A. (1999).

Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & Dev.* 13, 3191-3197.

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

Verma, S., and Eckstein, F. (1999). Modified oligonucleotides: Synthesis and strategy for users. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 99-134.

Voinnet, O., Lederer, C., and Baulcombe, D. C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103, 157-167.

Wassenegger, M. (2000). RNA-directed DNA methylation. *Plant Mol. Biol.* 43, 203-220.

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

Wu, H., Xu, H., Miraglia, L. J., and Crooke, S. T. (2000). Human RNase III is a 160 kDa Protein Involved in Preribosomal RNA Processing. *J. Biol. Chem.* 275, 17.

Yang, D., Lu, H. and Erickson, J.W. (2000) Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *drosophila* embryos. *Curr. Biol.*, 10, 1191-1200.

Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.

Zhang, K., and Nicholson, A. W. (1997). Regulation of ribonuclease III processing by double-helical sequence antideterminants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 13437-13441.

REIVINDICACIONES

1. Molécula de RNA bicatenario aislada en la forma de dos cadenas de RNA separadas, en donde cada cadena de RNA tiene una longitud de 19-23 nucleótidos, en donde dicha molécula de RNA es capaz de interferencia de RNA, en donde la molécula de RNA contiene al menos un análogo de nucleótido modificado, para uso en medicina.
- 5 2. La molécula de RNA para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos una cadena tiene un colgante 3' de 1-3 nucleótidos.
3. La molécula de RNA para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde cada cadena tiene una longitud de 20-22 nucleótidos.
- 10 4. La molécula de RNA para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en donde el colgante 3' está estabilizado contra la degradación.
5. La molécula de RNA para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el análogo de nucleótido modificado se selecciona de ribonucleótidos modificados en el azúcar o en la cadena principal.
- 15 6. La molécula de RNA para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el análogo de nucleótido es un ribonucleótido modificado en el azúcar, en donde el grupo 2'-OH está reemplazado por un grupo seleccionado de H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ o CN, en donde R es C₁-C₆ alquilo, alqueno o alquínilo y halo es F, Cl, Br o I.
7. La molécula de RNA para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el análogo de nucleótido es un ribonucleótido modificado en la cadena principal, que contiene un grupo fosfotioato.
- 20 8. La molécula de RNA para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que tiene una secuencia que tiene una identidad de al menos 70% con una molécula diana de mRNA predeterminada.
9. La molécula de RNA para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde las cadenas de RNA se sintetizan química o enzimáticamente.
- 25 10. La molécula de RNA para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para administración por suministro mediado por portador o inyección.
11. La molécula de RNA para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 dirigida contra un gen en un mamífero, particularmente un humano.
12. La molécula de RNA para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el gen está asociado con una afección patológica.
- 30 13. La molécula de RNA para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el gen es un gen asociado a un patógeno, preferiblemente un gen viral, o en donde el gen es un gen asociado a un tumor o en donde el gen es un gen asociado a una enfermedad autoinmune.
14. La molécula de RNA para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el uso es en medicina humana.
- 35 15. Composición farmacéutica que contiene como agente activo al menos una molécula de RNA bicatenario de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y un portador farmacéutico.
16. La composición de la reivindicación 15, para uso en aplicaciones diagnósticas in vivo.
17. La composición de la reivindicación 15, para uso en aplicaciones terapéuticas.

FIGURA 1A

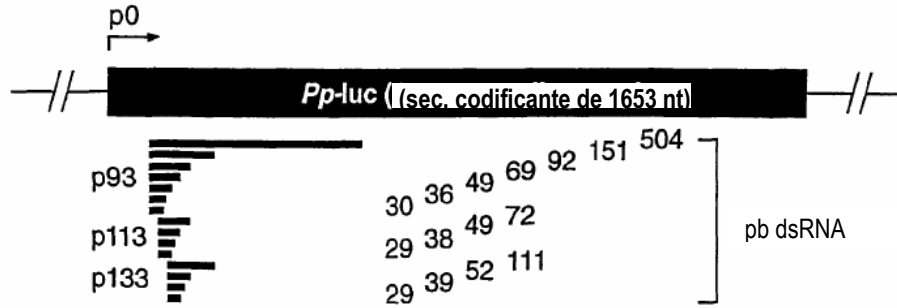


FIGURA 1B

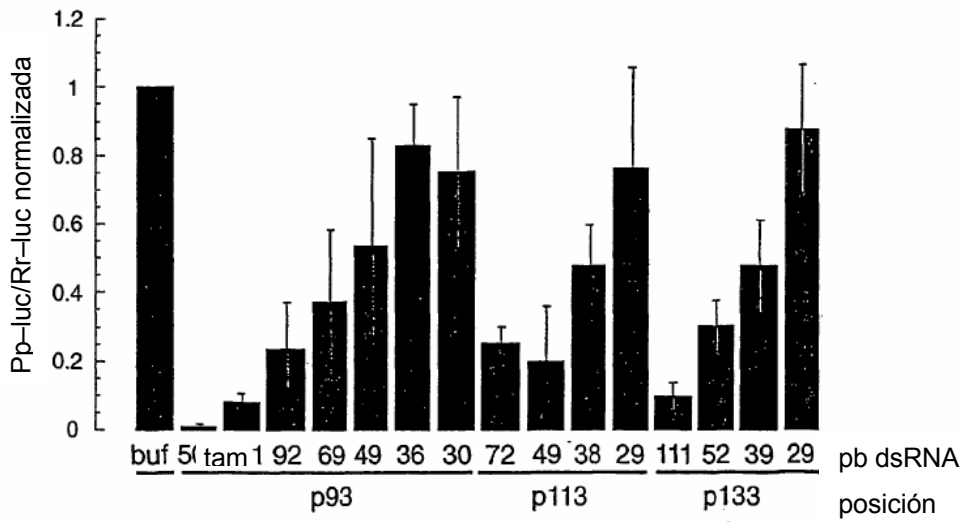


FIGURA 2

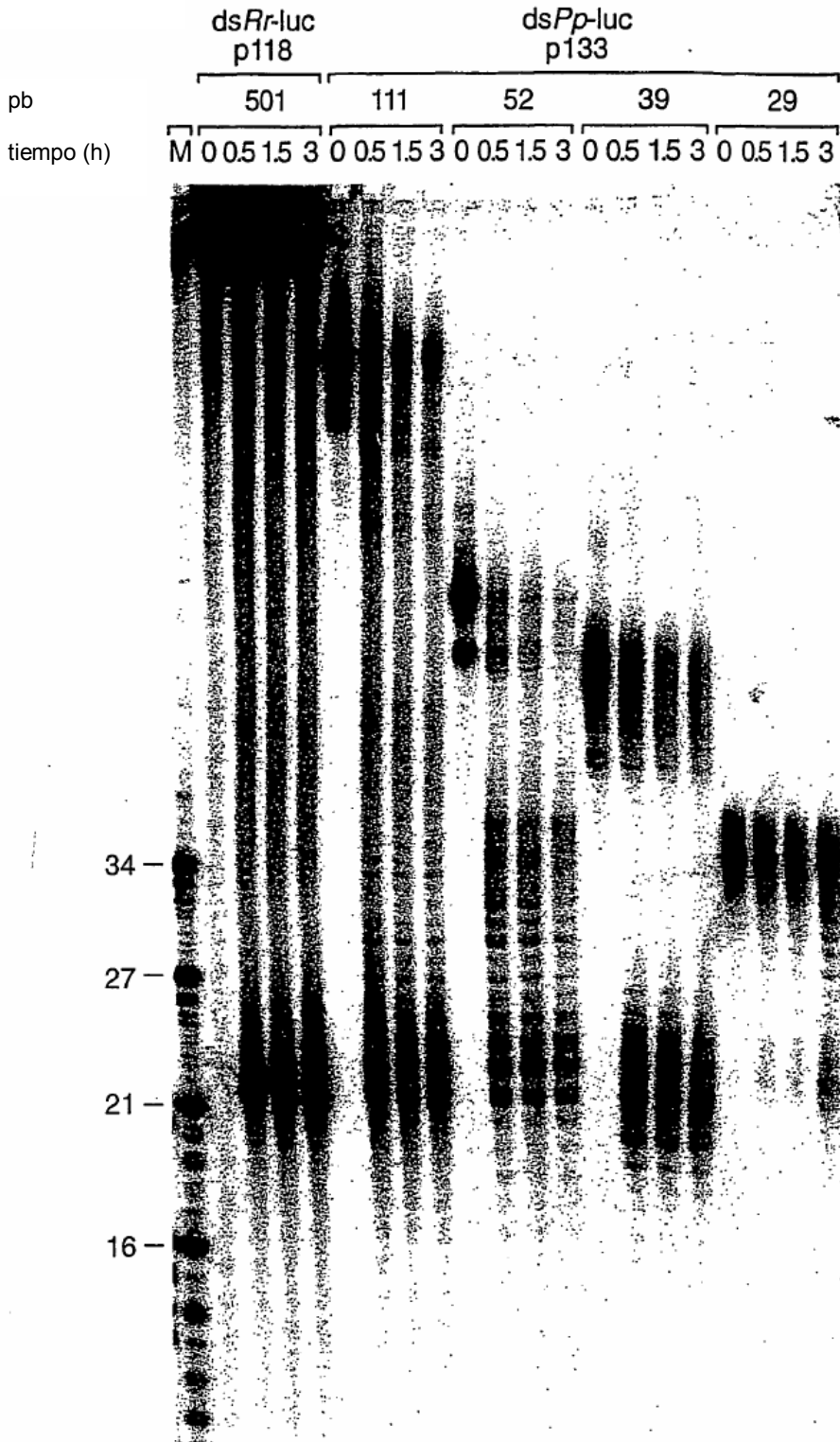


FIGURA 3A

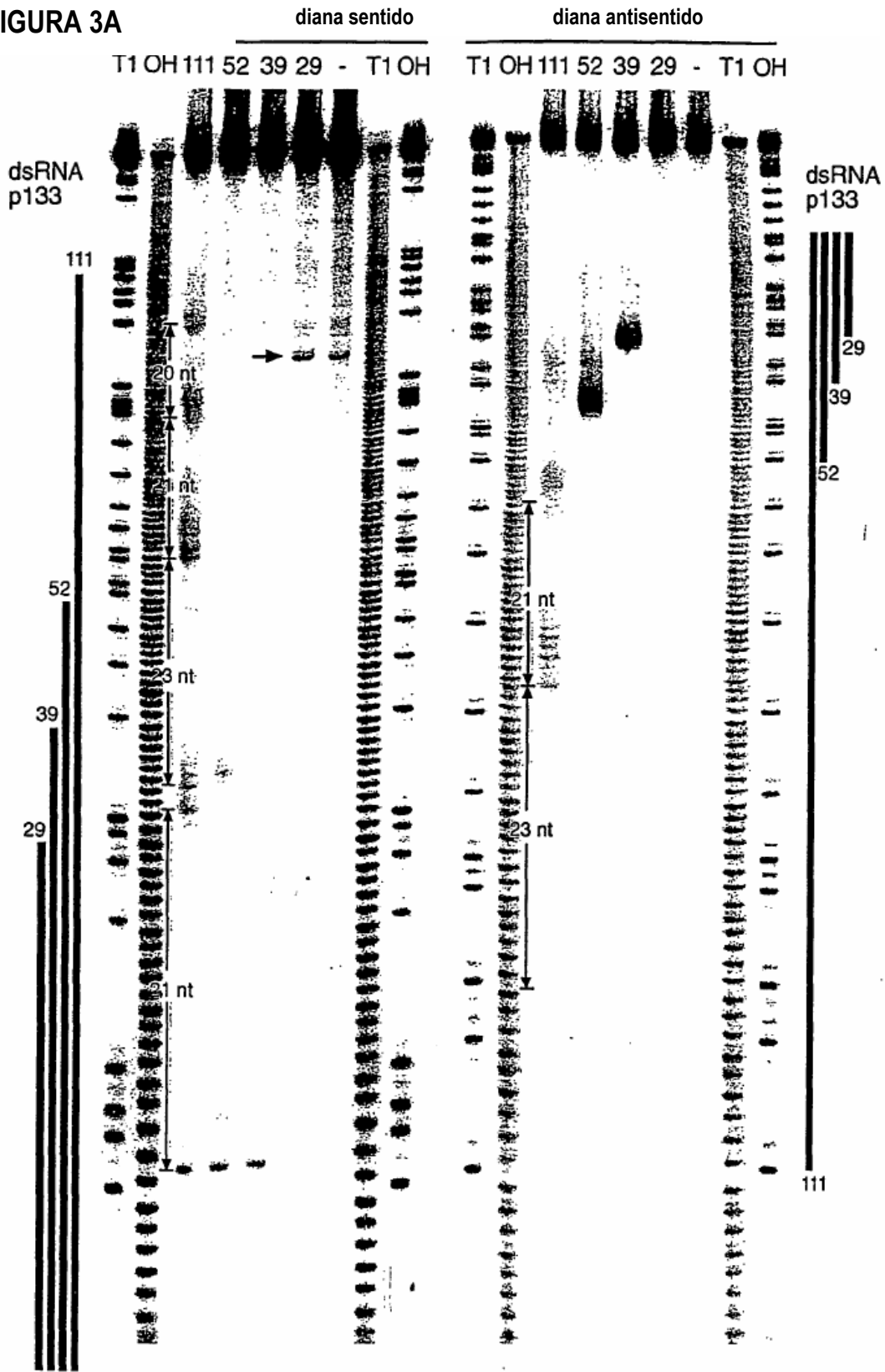


FIGURA 3B

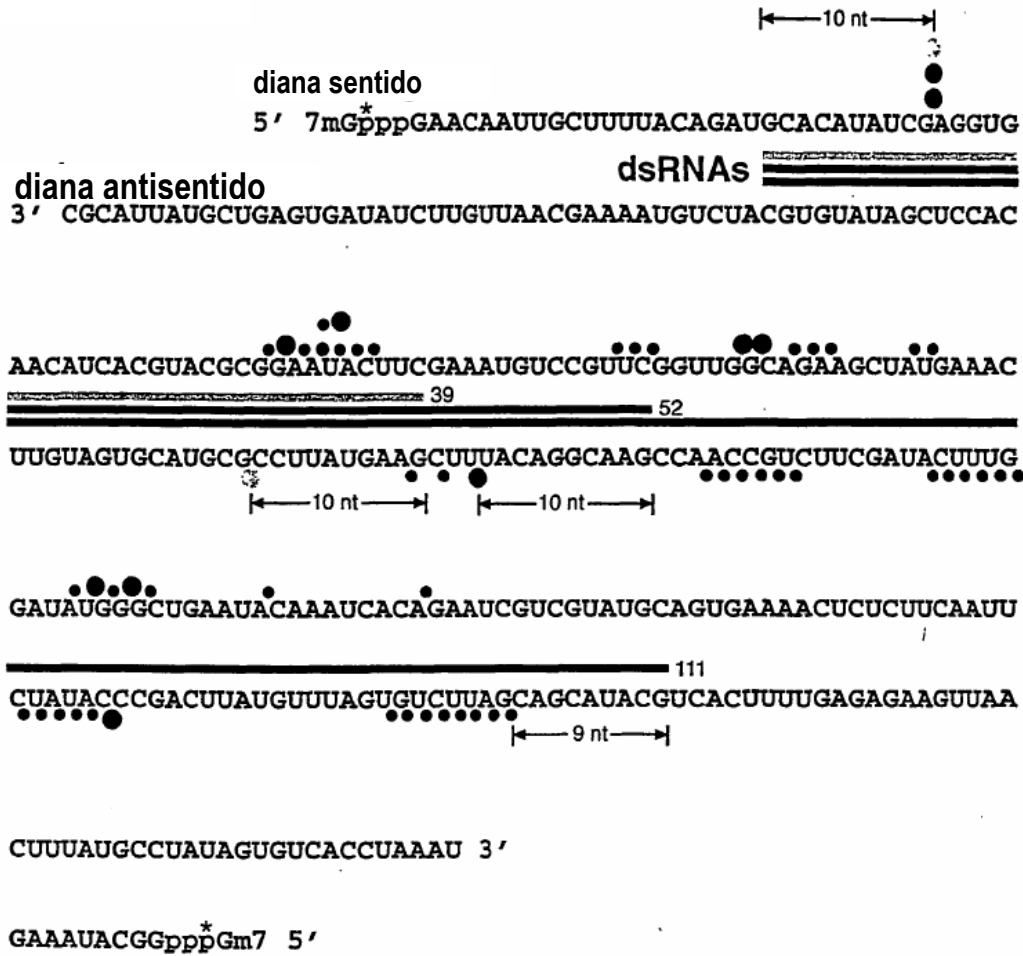


FIGURA 4A

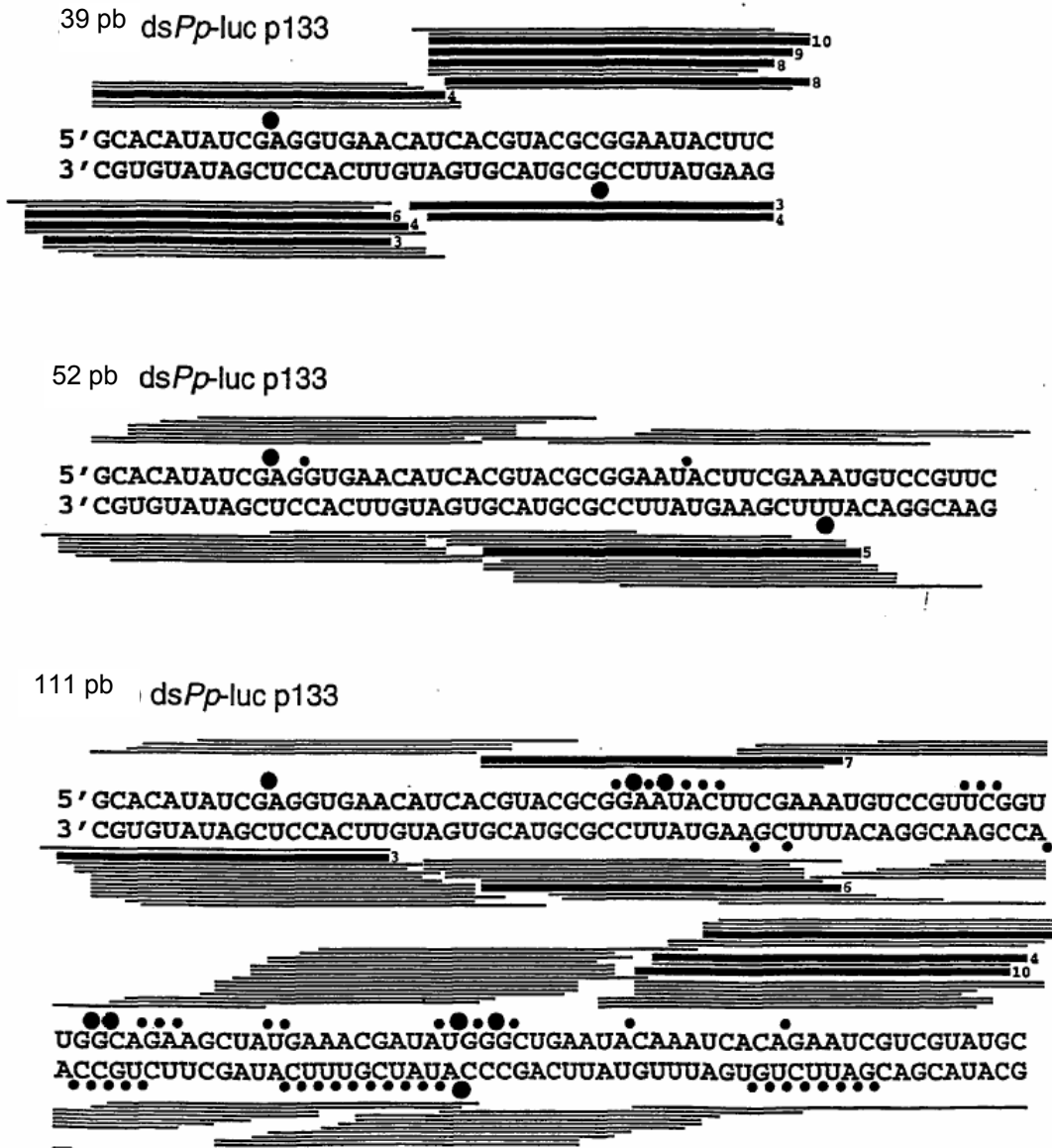


FIGURA 4B

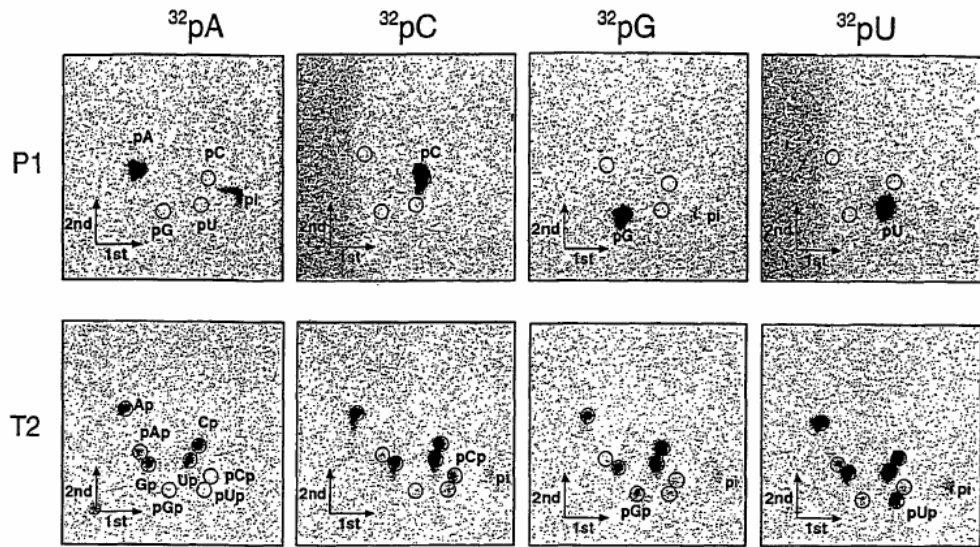


FIGURA 5A

siRNAs/
dsRNA

ds52
(control)

5' GCACAUAUCGAGGUGAACAUACGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUC
3' CACGUGUAUAGCUCCACUUGUAGUGCAUGCGCCUUAUGAAGCUUUACAG

1

2

3

4

5

6

7

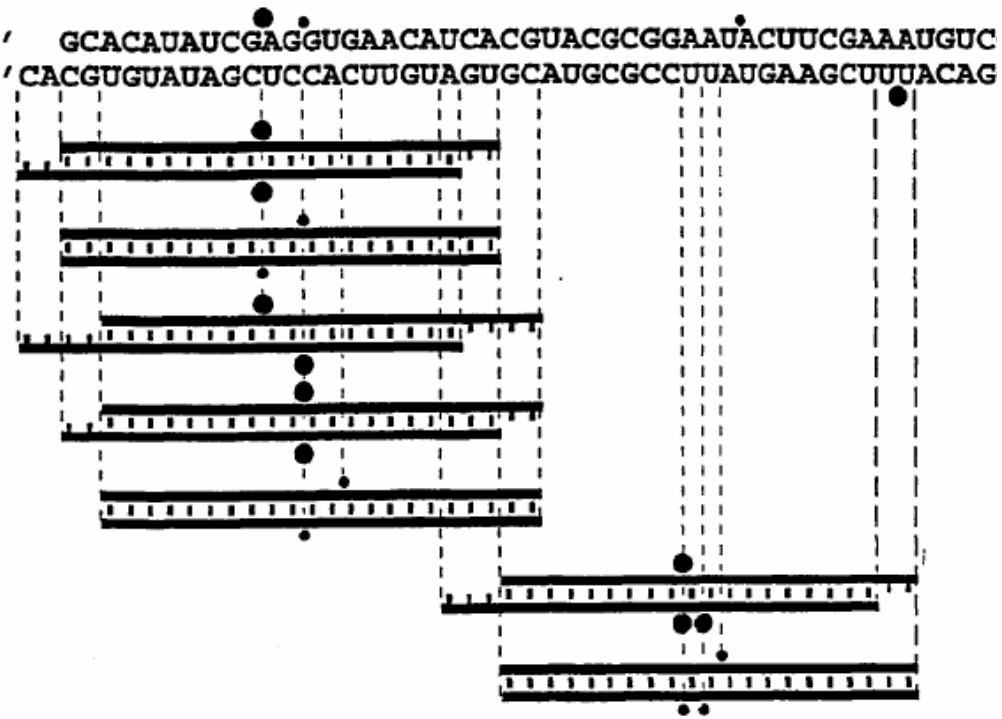


FIGURA 5B

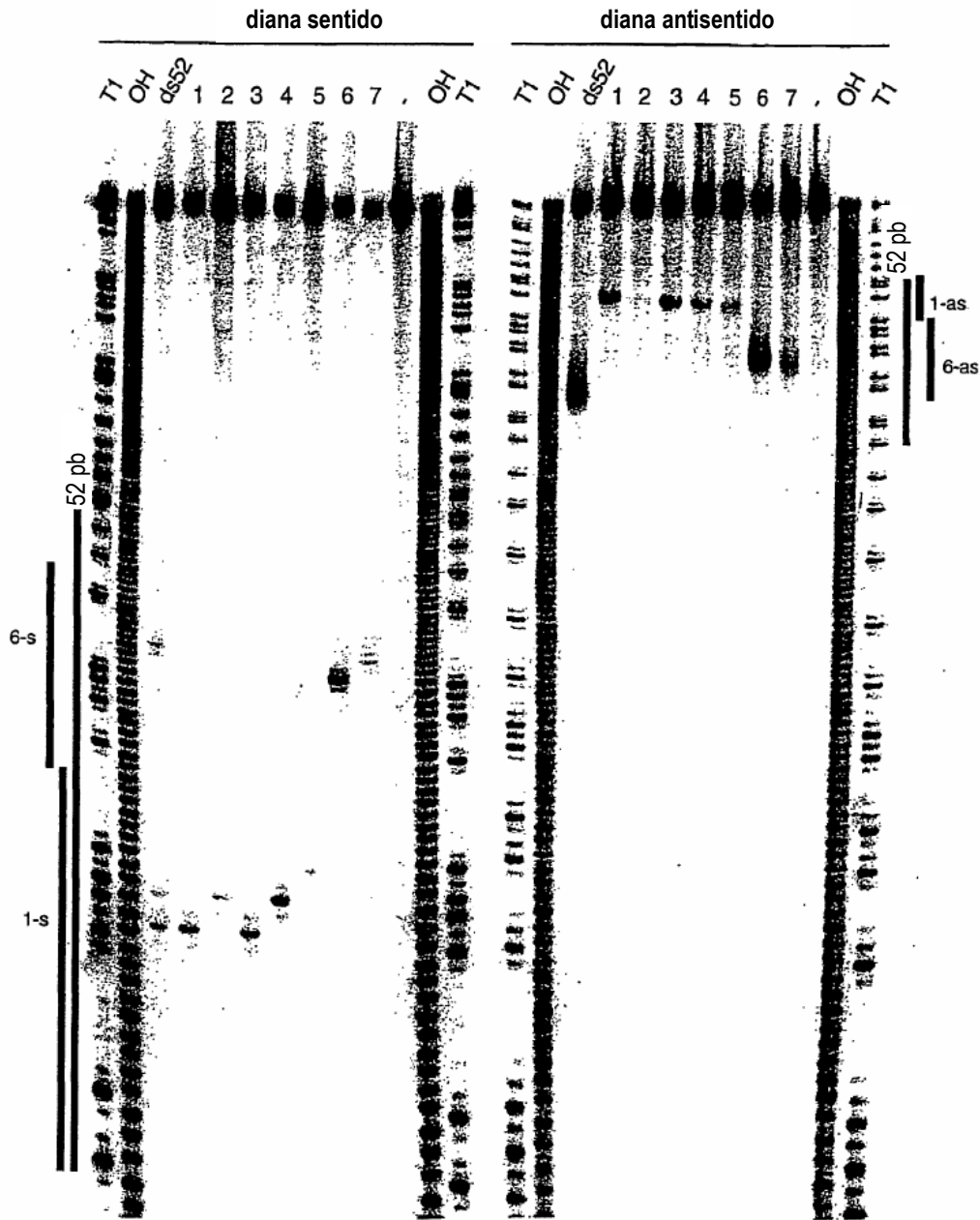


FIGURA 6A

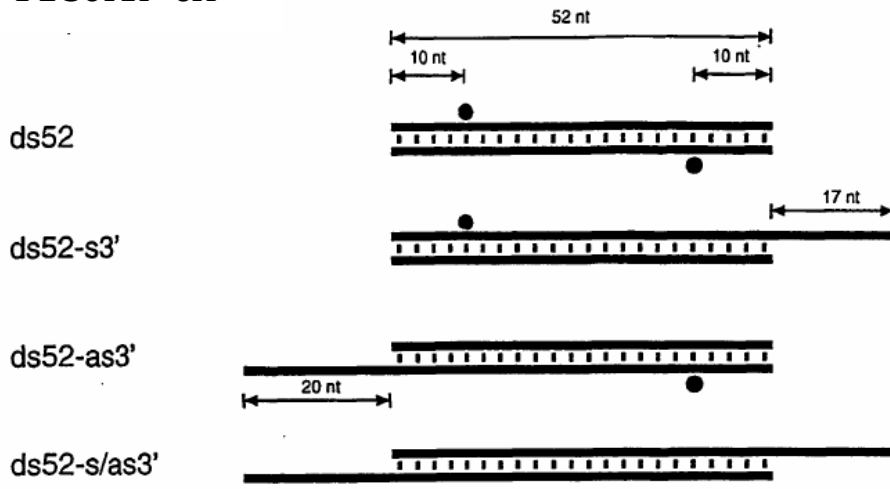
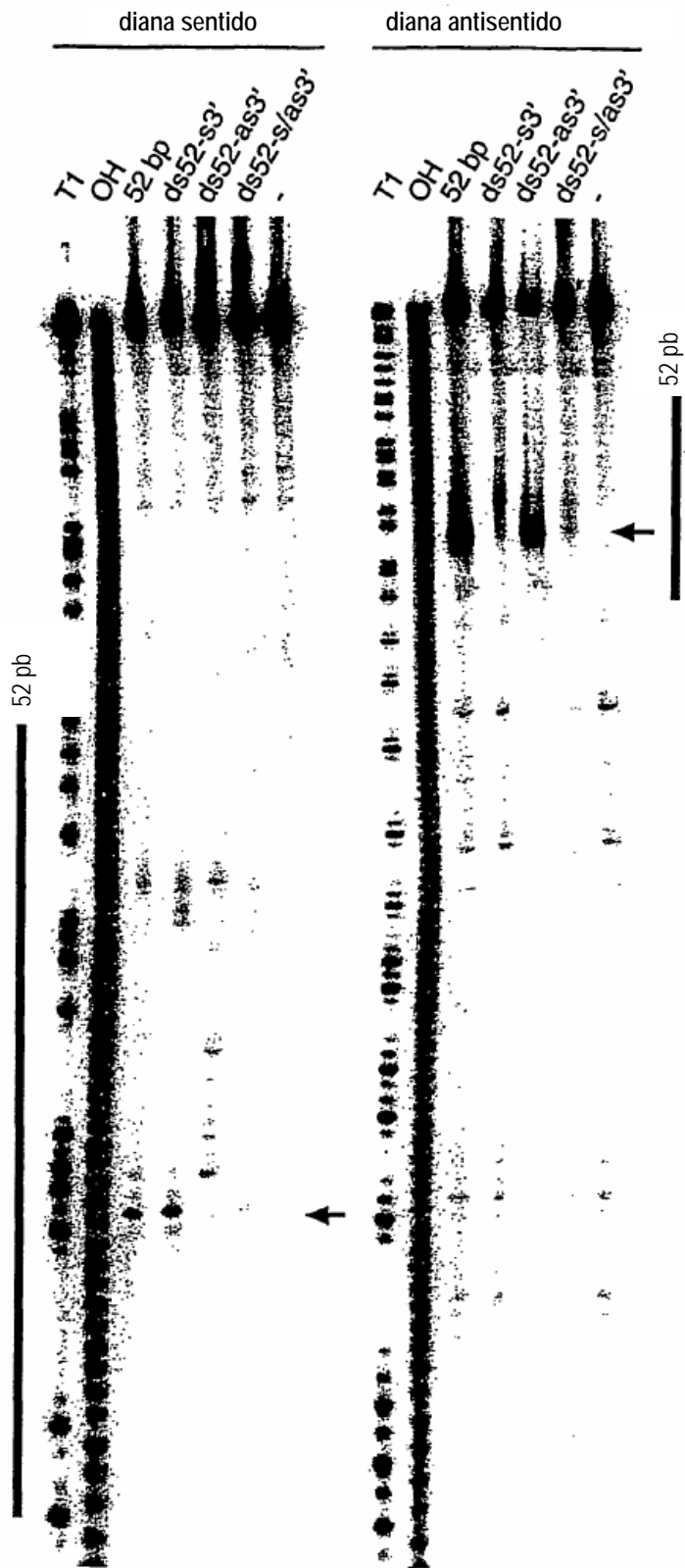


Figura 6B



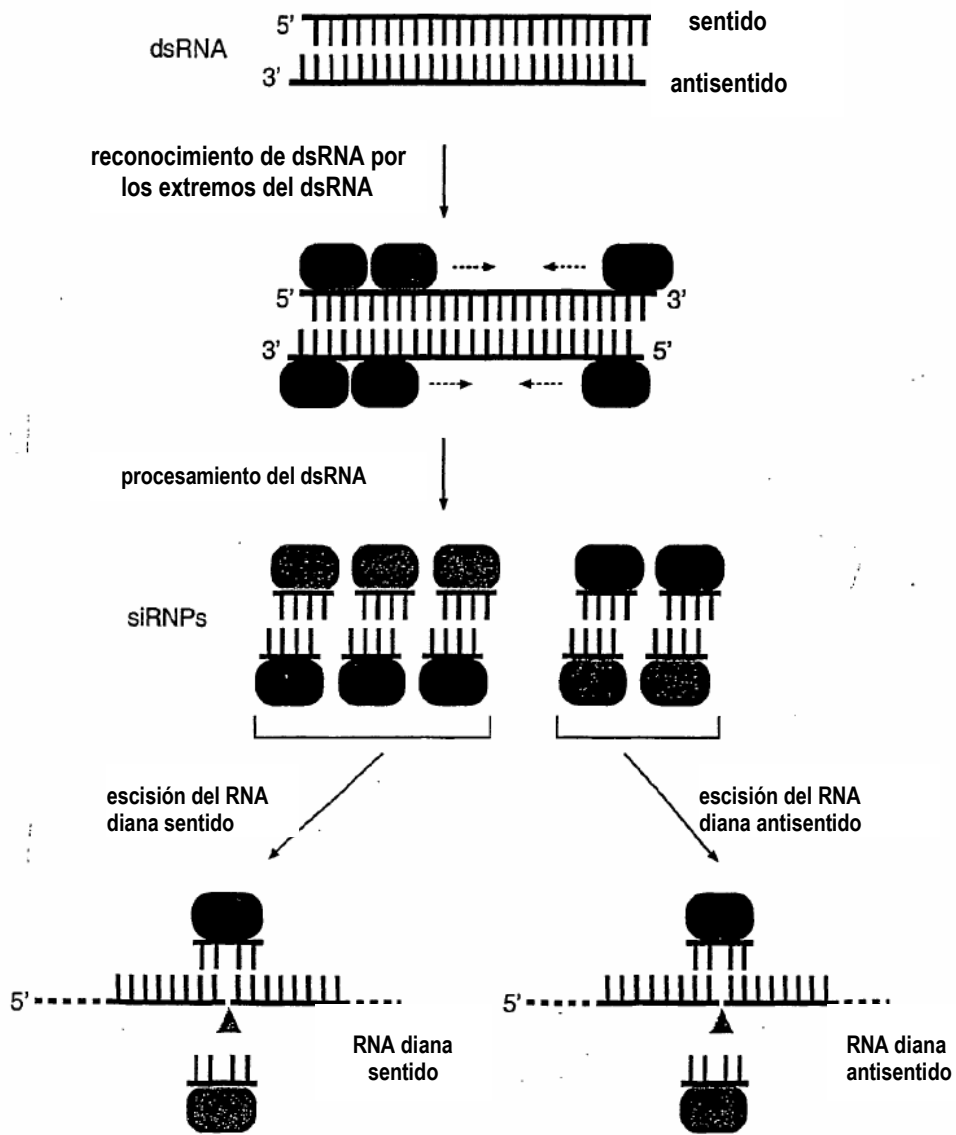
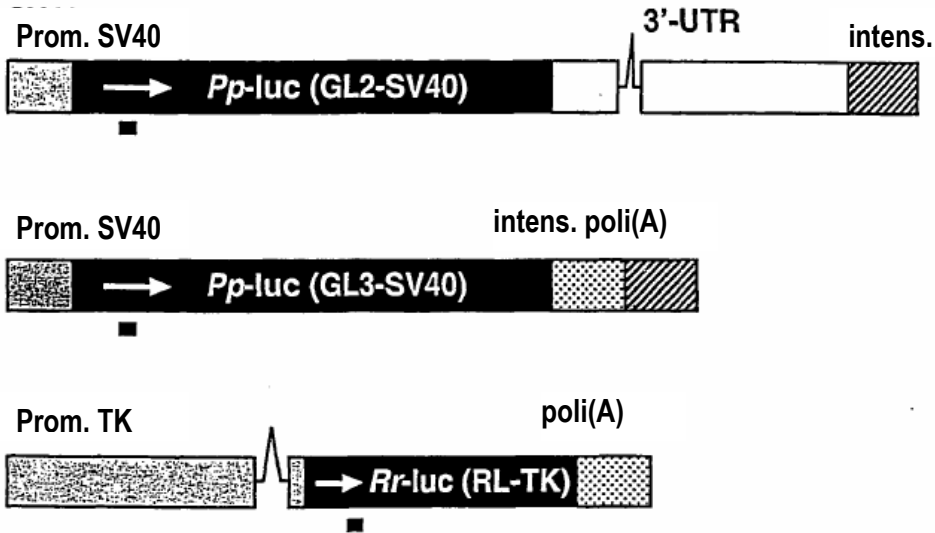


FIGURA 7

a



b

dúplex de siRNA

uGL2	5' CGUACGCGGAUACUUCGAUU UUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'
GL2	5' CGUACGCGGAUACUUCGATT TTGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'
GL3	5' CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU 5'
invGL2	5' AGCUUCAUAAGGCGCAUGCTT TTUCGAAGUAUCCGCGUACG 5'
RL	5' AAACAUGCAGAAAUGCUGTT TFUUUGUACGUCUUUUACGAC 5'

FIGURA 8

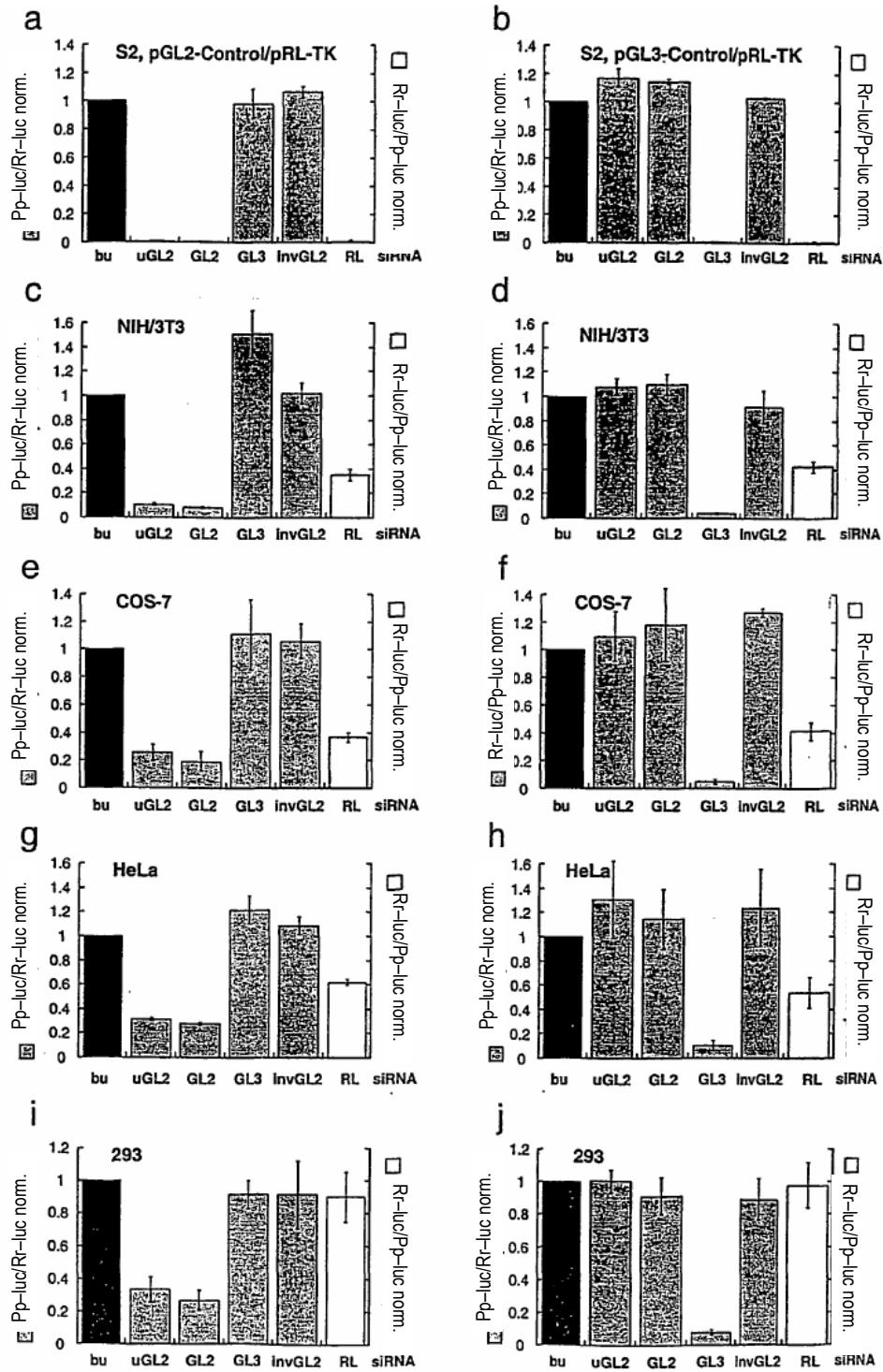


FIGURA 9

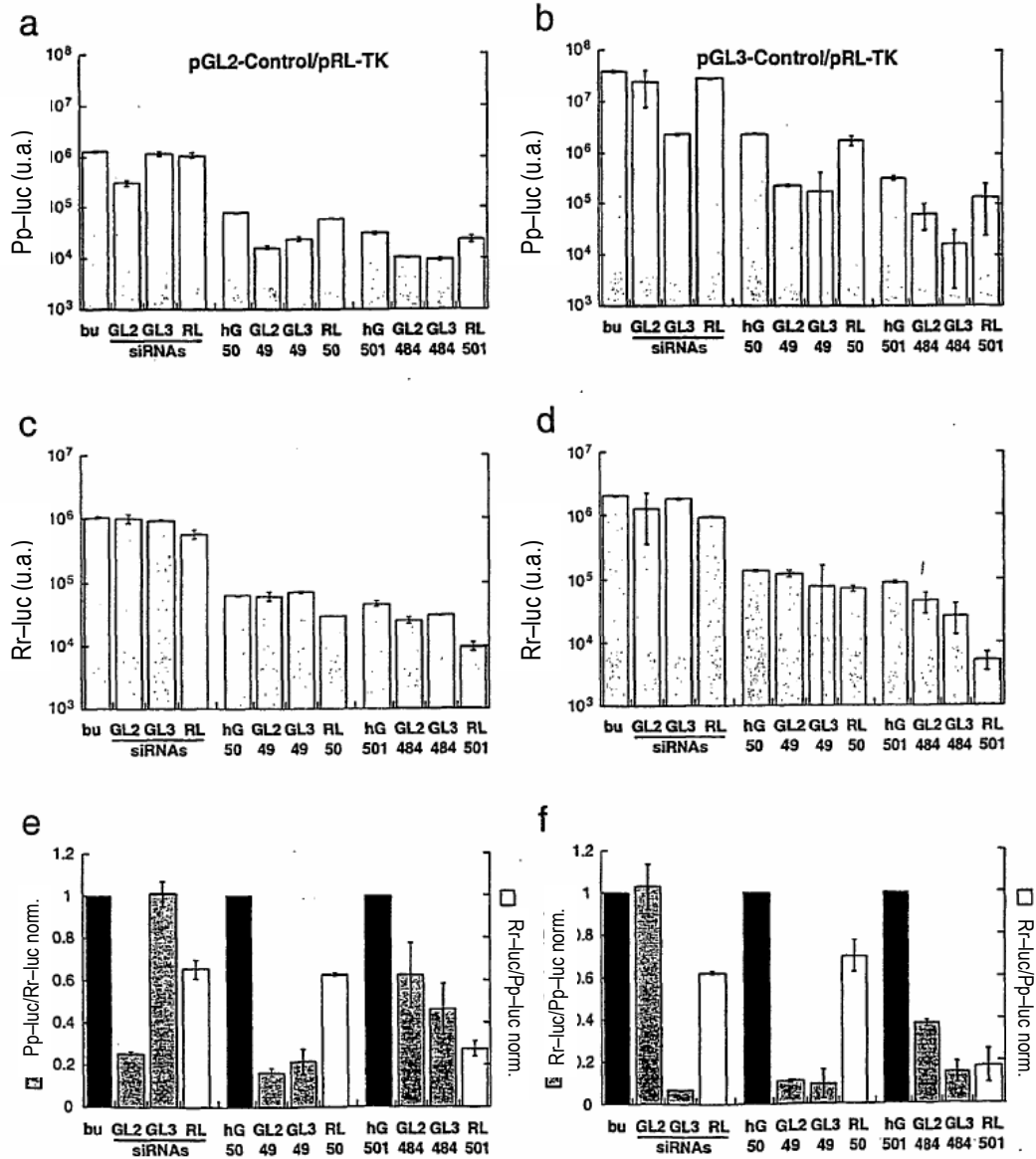


FIGURA 10

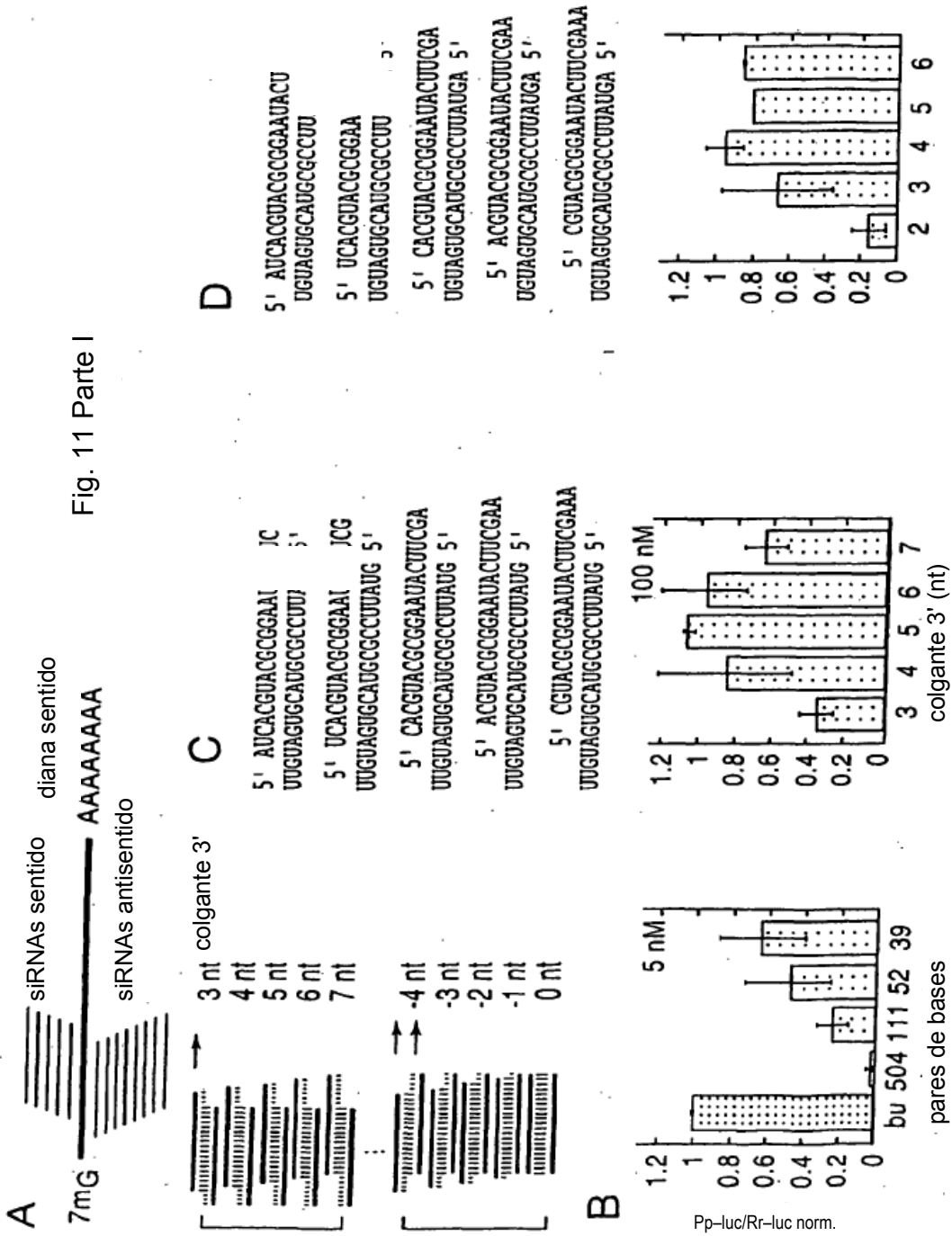


Fig. 11 Parte I

Fig. 11 Parte II

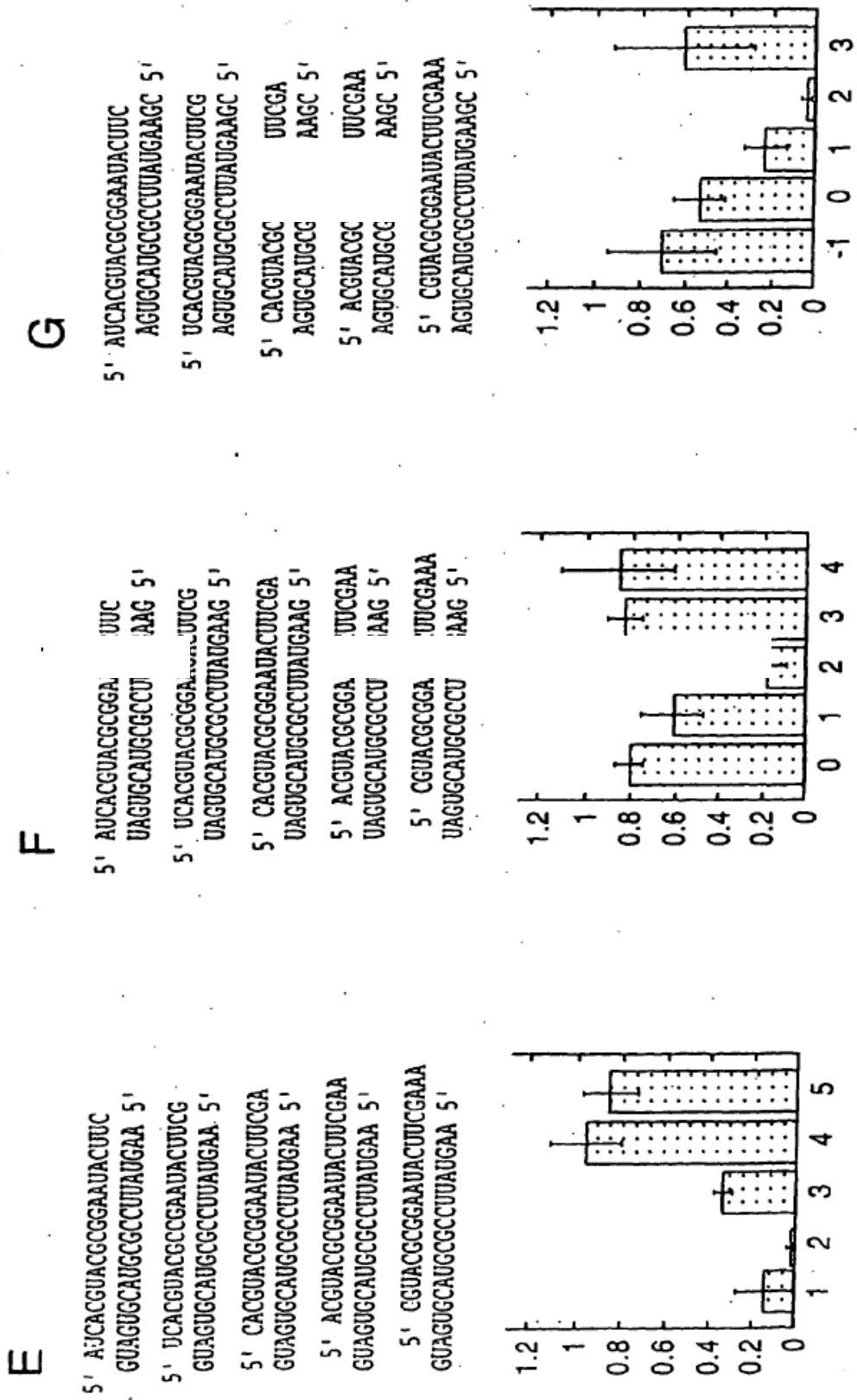


Fig. 11 Parte III

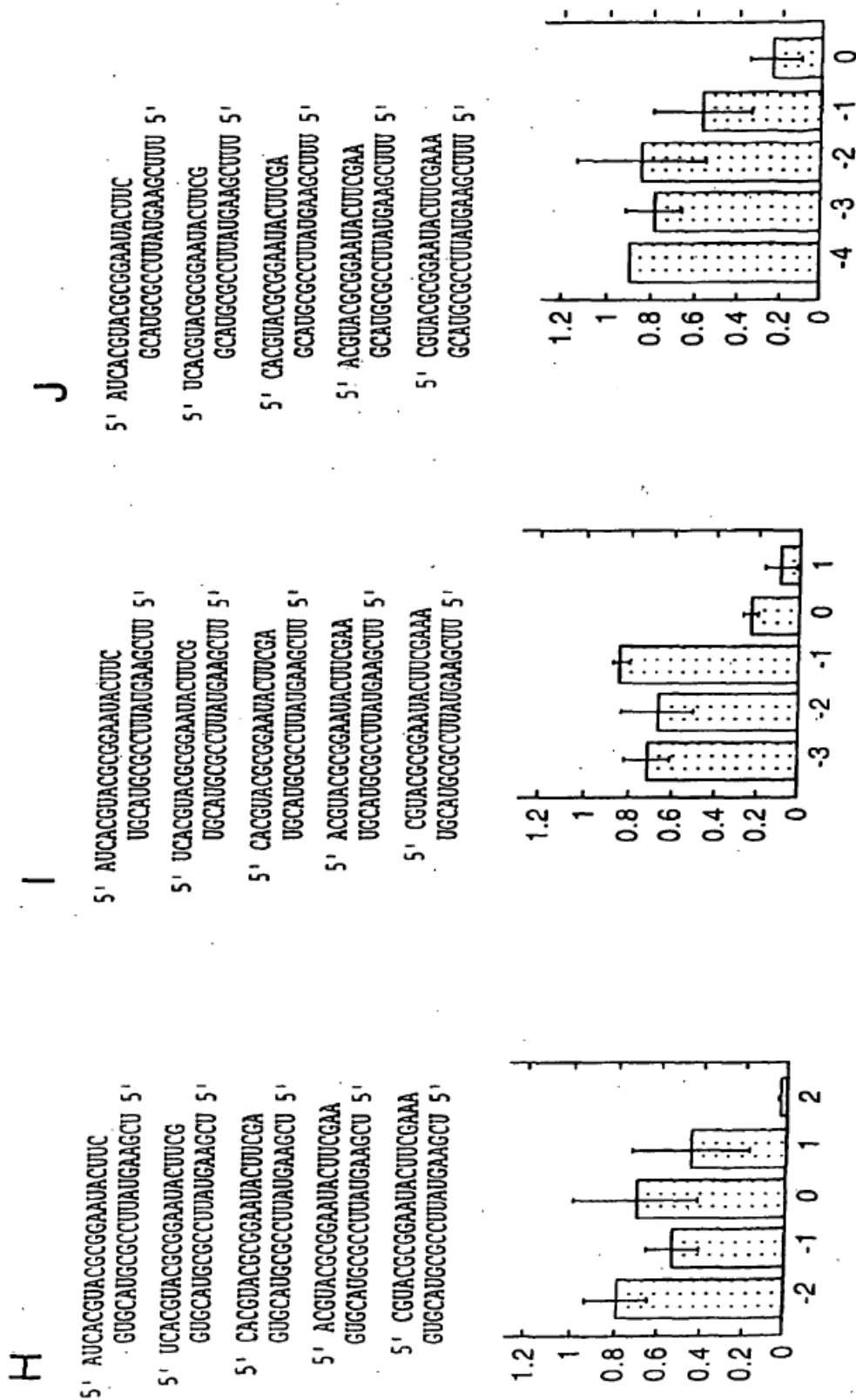


Fig. 12 Parte I

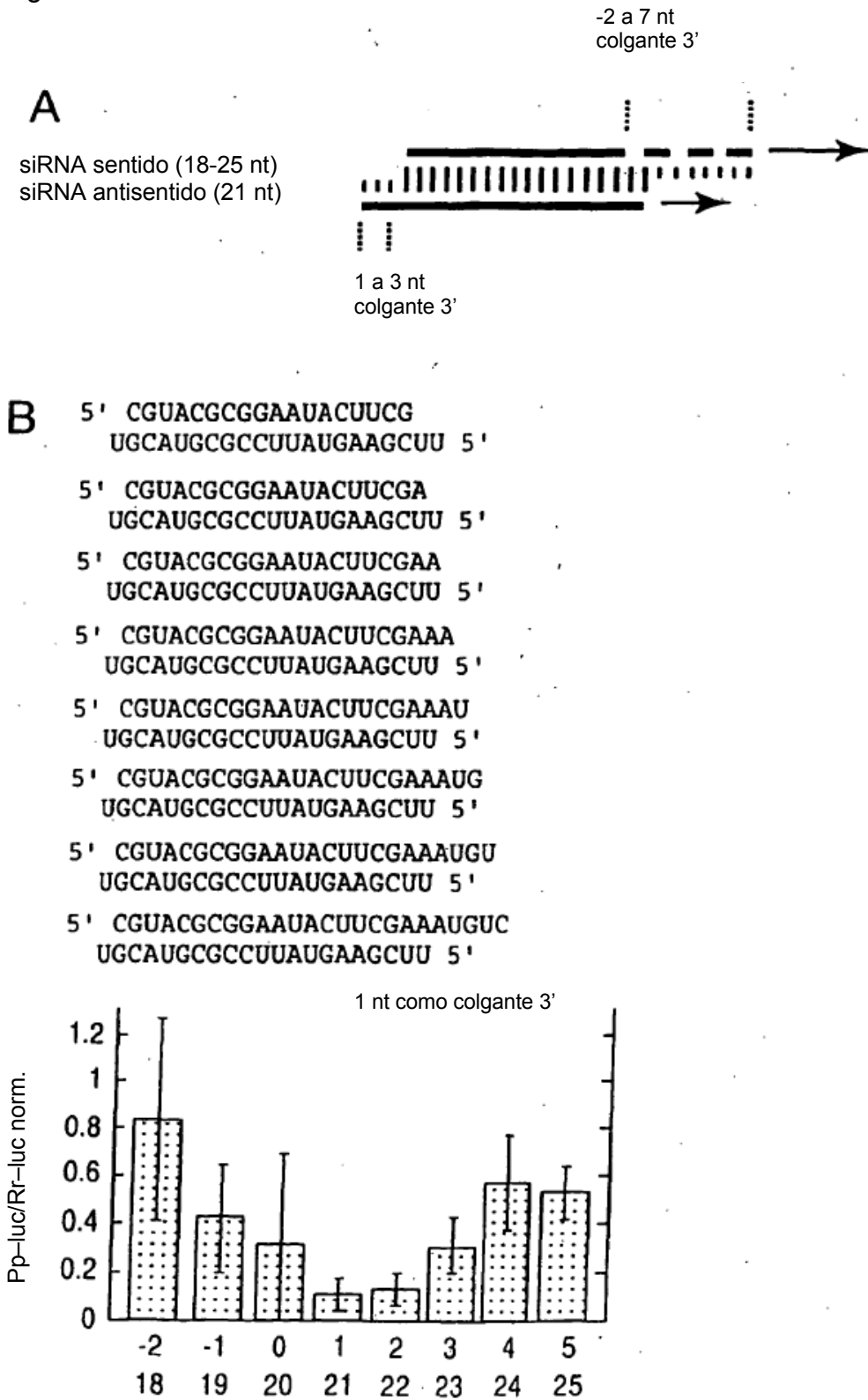


Fig.12 Part II

C

5' CGUACGCGGAAUACUUCG
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGA
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAA
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAA
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAU
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUG
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGU
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUC
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

D

5' CGUACGCGGAAUACUUCG
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGA
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAA
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

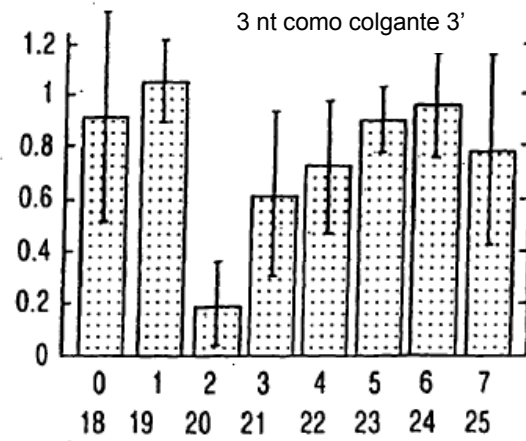
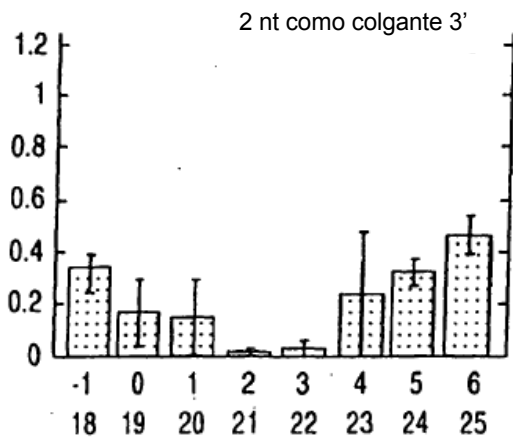
5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAA
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAU
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUG
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGU
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUC
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'



colgante 3' de la cadena sentido (nt)
longitud de la cadena sentido (nt)

FIGURA 13

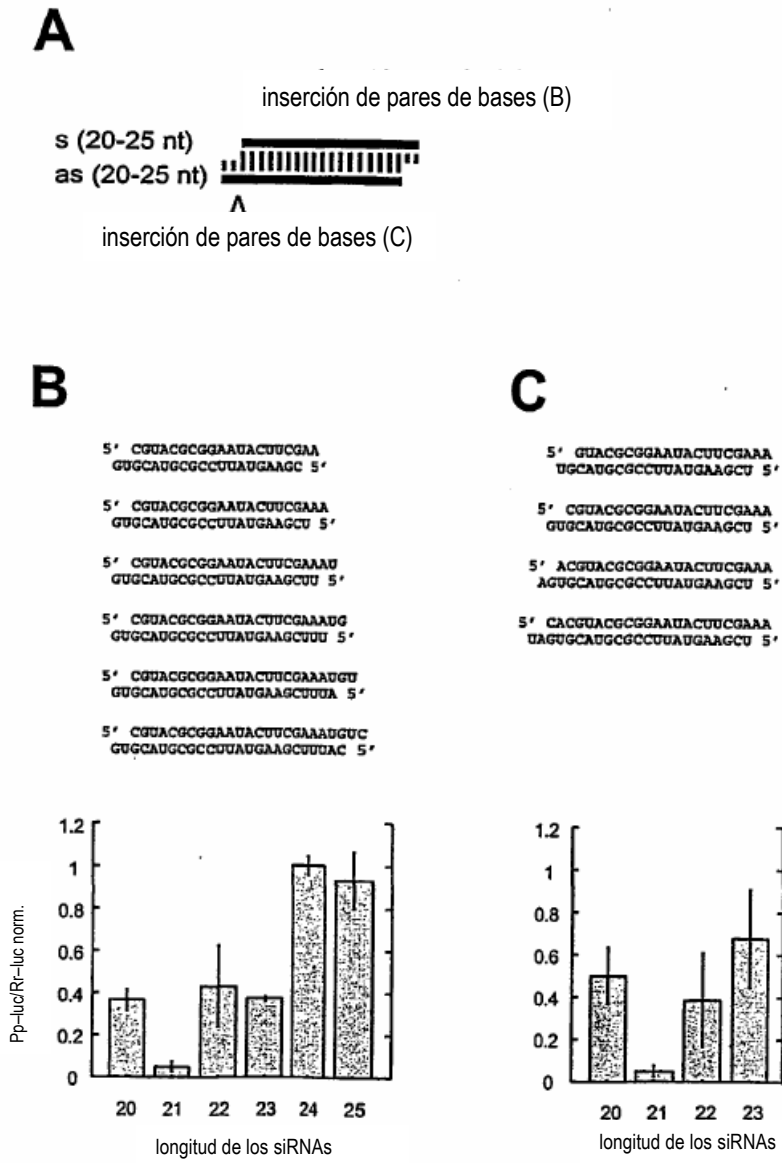


FIGURA 14

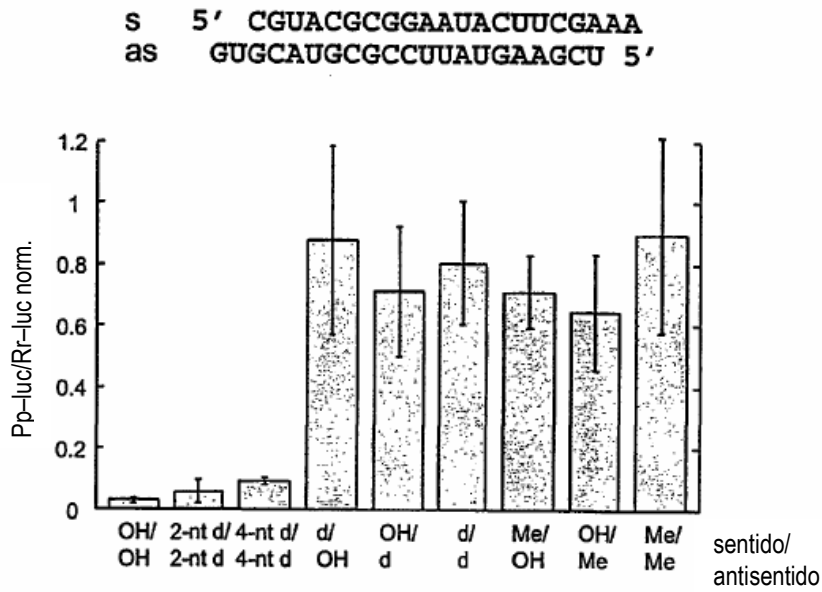


FIGURA 15

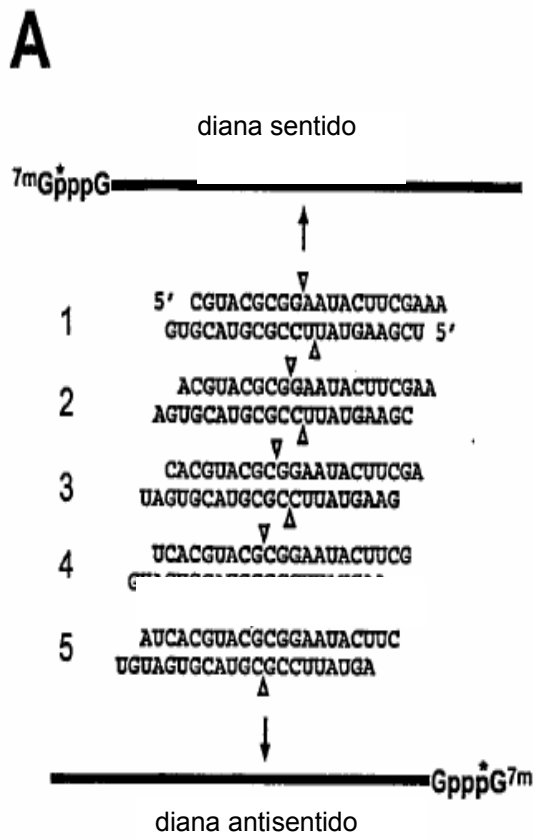


FIGURA 16

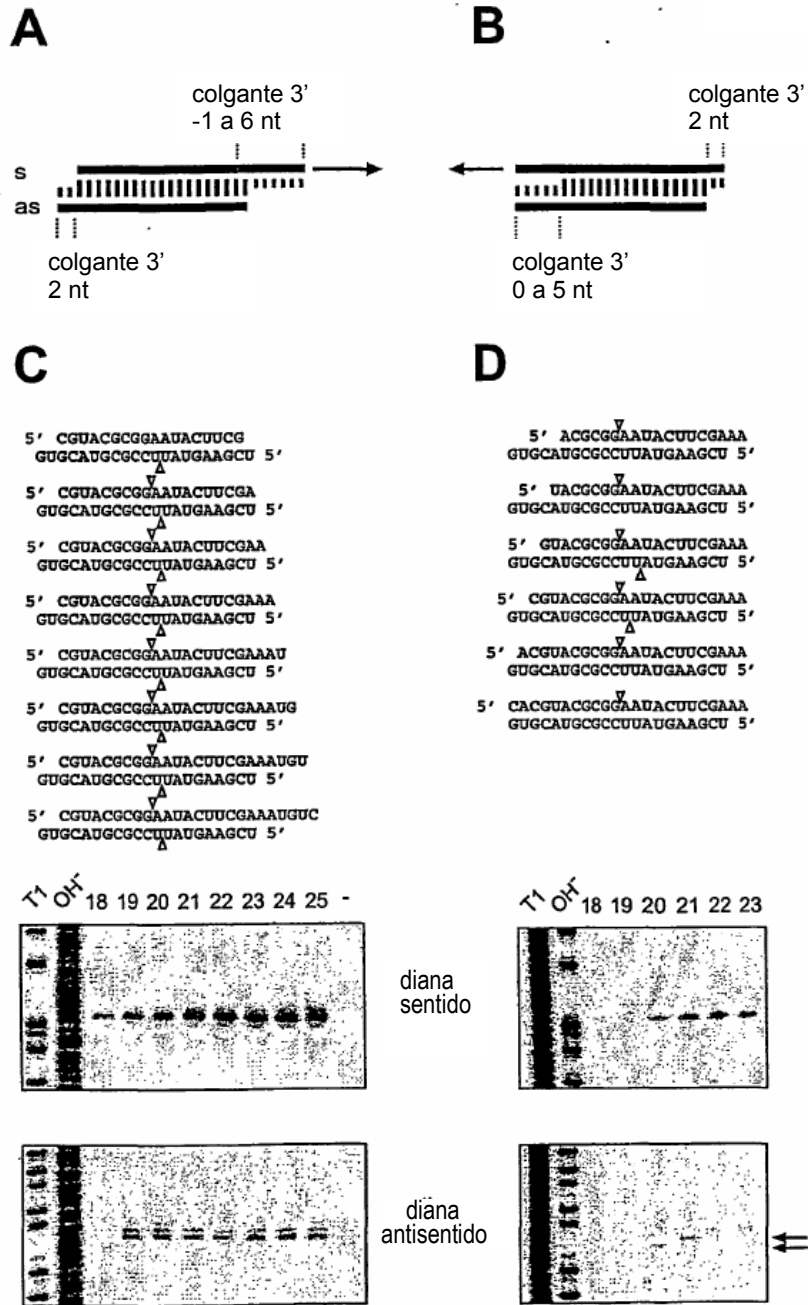


FIGURA 17

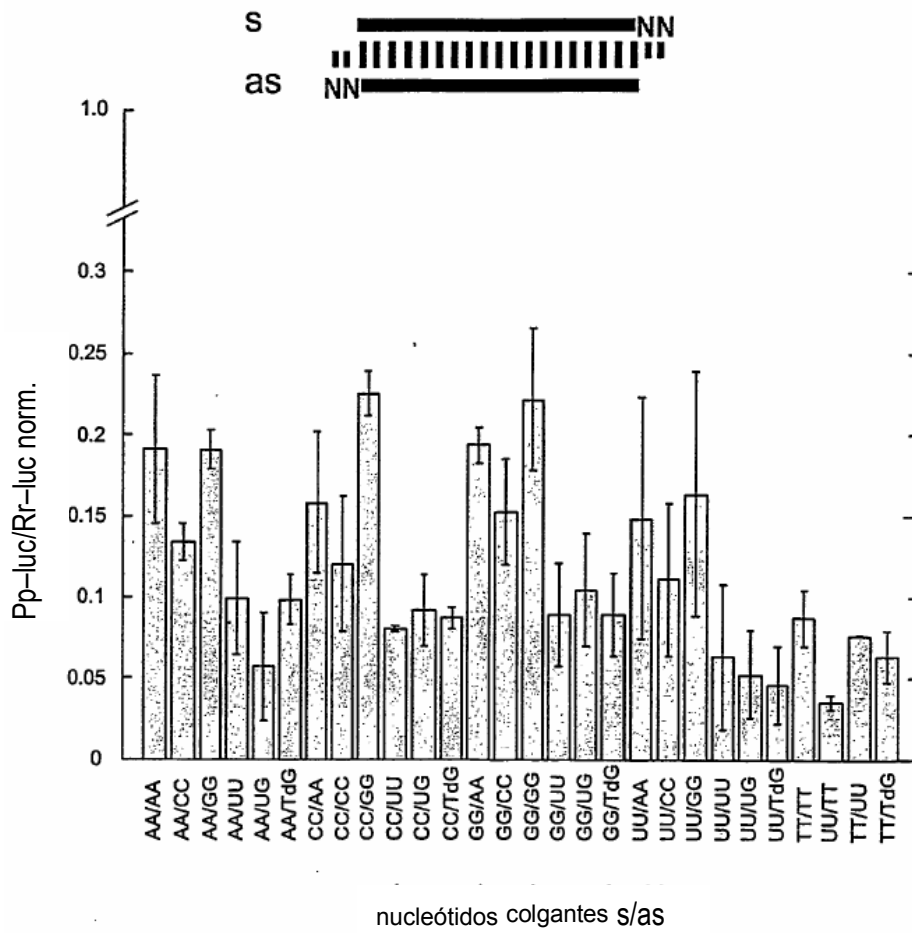


FIGURA 18

```

ref  5' CGUACGCGGAAUACUUCGATT
      TTGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

1    5' AUGGCGCGGAAUACUUCGATT
      TTUACGCGCCUUAUGAAGCU 5'

2    5' CGUACGCGGAAUACUUCGATT
      TTGCAUGCGGCUUAUGAAGCU 5'

3    5' CGUACGCGAGUAACUUCGATT
      TTGCAUGCGCUCAUUGAAGCU 5'

4    5' CGUACGCGGAAUUUCCGATT
      TTGCAUGCGCCUUAAGUGCU 5'

5    5' CGUACGCGGAAUACUUAGGT
      TTGCAUGCGCCUUAUGAAUC 5'

6    5' CGUACGCGGUAUACUUCGATT
      TTGCAUGCGCCAUAUGAAGCU 5'

7    5' CGUACGCGGAUACUUCGATT
      TTGCAUGCGCCAUAUGAAGCU 5'
    
```

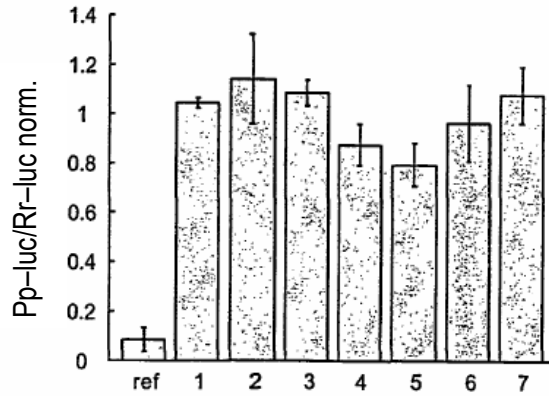


FIGURA 19

