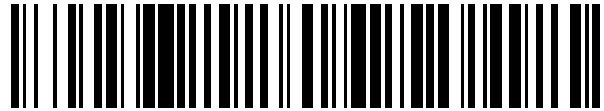


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 284**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2003 E 10012132 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2284266**

54 Título: **ARNip dirigido a tp53**

30 Prioridad:

14.11.2002 US 426137 P

10.09.2003 US 502050 P

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

28.01.2014

73 Titular/es:

**THERMO FISHER SCIENTIFIC BIOSCIENCES INC.
(100.0%)**

**2650 Crescent Drive, Suite 100
Lafayette, CO 80026, US**

72 Inventor/es:

**KHVOROVA, ANASTASIA;
REYNOLDS, ANGELA;
LEAKE, DEVIN;
MARSHALL, WILLIAM y
SCARINGE, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 440 284 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

ARNip dirigido a tp53

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la interferencia por ARN ("iARN").

10 **Antecedentes de la invención**

Hace relativamente poco, los investigadores observaron que el ARN bicatenario ("ARNbc") se podría usar para inhibir la expresión de proteínas. Esta capacidad de silenciar un gen tiene un amplio potencial para el tratamiento de enfermedades humanas, y muchos investigadores y entidades comerciales están invirtiendo en la actualidad importantes recursos en el desarrollo de terapias basadas en esta tecnología.

15 El silenciamiento génico inducido por ARN bicatenario puede aparecer en al menos tres niveles diferentes: (i) inactivación de la transcripción, que se refiere a la metilación de las histonas o del ADN guiada por ARN, (ii) degradación del ARNm inducida por ARNip, y (iii) atenuación transcripcional inducida por ARNm.

20 Se considera generalmente que el principal mecanismo de silenciamiento inducido por ARN (interferencia por ARN, o iARN) en células de mamífero es la degradación del ARNm. Los intentos iniciales de usar el iARN en células de mamífero se centraron en el uso de largas cadenas de ARNbc. Sin embargo, estos intentos de inducir iARN encontraron con un éxito limitado, debido en parte a la inducción de la respuesta de interferón, que resulta en una inhibición general de la síntesis de proteínas, en lugar de una inhibición específica de la diana. Así, un ARNbc largo no es una opción viable para el iARN en sistemas de mamíferos.

Más recientemente se demostró que cuando se introducen las dobles cadenas de ARN cortas (18-30 pb) en células de mamífero en cultivo, puede realizarse la inhibición específica de la secuencia del ARNm diana sin inducir una respuesta de interferón. Algunos de estos ARNbc cortos, denominados ARN inhibidores pequeños ("ARNip"), pueden actuar catalíticamente a concentraciones submolares para escindir más del 95% del ARNm diana en la célula. Una descripción de los mecanismos para la actividad de ARNip, así como también algunas de sus aplicaciones se describen en Provost y otros, Ribonuclease Activity and RNA Binding of Recombinant Human Dicer, EMBO J., 2002 nov. 1; 21 (21): 5864-5874; Tabara y otros, The dsRNA Binding Protein RDE-4 Interacts with RDE-1, DCR-1 and a DexH-box Helicase to Direct RNAi in *C. elegans*, Cell 2002, junio 28;109(7):861-71; Ketting y otros, Dicer Functions in RNA Interference and in Synthesis of Small RNA Involved in Developmental Timing in *C. elegans*, Martínez y otros, Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi, Cell 2002, sept. 6; 110(5):563; Hutvagner & Zamore, A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex, Science 2002, 297:2056.

40 Desde un punto de vista mecanicista, la introducción de ARN largos bicatenarios en células de plantas e invertebrados se fragmenta en ARNip mediante una endonucleasa tipo III conocida como Dicer. Sharp, *RNA interference-2001*, Genes Dev. 2001, 15:485. Dicer, una enzima similar a la ribonucleasa III, procesa el ARNbc en ARN de interferencia cortos de 19-23 pares de bases con dos bases colgantes características en 3'. Bernstein, Caudy, Hammond, & Hannon, Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference, Nature 2001, 409:363. Los ARNip se incorporan después en un complejo silenciador inducido por ARN (RISC) donde una o más helicasas desenrollan la doble cadena de ARNip, lo que permite que la cadena no codificante complementaria guíe al reconocimiento de la diana. Nykanen, Haley, & Zamore, ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway, Cell 2001, 107:309. Tras la unión al ARNm diana adecuado, una o más endonucleasas dentro del RISC escinden la diana para inducir silenciamiento. Elbashir, Lendeckel, & Tuschl, RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs, Genes Dev 2001, 15:188, **Figura 1.**

50 El efecto de interferencia puede ser de larga duración y puede ser detectable después de muchas divisiones celulares. Por otra parte, el iARN exhibe especificidad de secuencia. Kisielow, M. y otros (2002) Isoform-specific knockdown and expression of adaptor protein ShcA using small interfering RNA, J. of Biochemistry 363:1-5. Así, la maquinaria de iARN puede reducir específicamente un tipo de transcrito, mientras que no afecta a ARNm estrechamente relacionados. Estas propiedades hacen al ARNip una herramienta potencialmente valiosa para la inhibición de la expresión génica y el estudio de la función de genes y la validación de dianas de fármacos. Por otra parte, los ARNip son potencialmente útiles como agentes terapéuticos contra: (1) enfermedades causadas por la sobreexpresión o expresión errónea de genes, y (2) enfermedades provocadas por la expresión de genes que contienen mutaciones.

El silenciamiento exitoso de genes dependiente de ARNip depende de un número de factores. Uno de los temas más polémicos en el iARN es la cuestión de la necesidad del diseño del ARNip, es decir, considerar la secuencia del ARNip que se usa. Los primeros trabajos en *C. elegans* y plantas evitaron el tema del diseño mediante la introducción de ARNbc largos (ver, por ejemplo, Fire, A. y otros (1998) Nature 391:806-811). En este organismo primitivo, las moléculas de ARNbc largos se escinden en ARNip mediante Dicer, generando así una población variada de dobles cadenas que pueden cubrir potencialmente todo el transcrito. Si bien una fracción de estas moléculas no son funcionales (*es decir* inducen poco o ningún silenciamiento) una o más tienen el potencial de ser altamente funcionales, silenciando de esta manera el gen de interés y aliviando la necesidad del diseño de ARNip. Desafortunadamente, debido a la respuesta de interferón, este mismo enfoque no está disponible para los sistemas de mamíferos. Si bien este efecto puede evitarse al no pasar por la etapa de escisión por Dicer e introducir directamente el ARNip, esta táctica lleva consigo el riesgo de que la secuencia elegida de ARNip puede ser no funcional o semifuncional.

Un número de investigaciones han expresado la opinión de que el diseño de ARNip no es un elemento crucial del iARN. Por otro lado, otros en el campo han comenzado a explorar la posibilidad de que el iARN pueda hacerse más eficiente mediante la atención al diseño, del ARNip. Desafortunadamente, ninguno de los métodos reportados ha proporcionado un esquema satisfactorio para la selección de forma fiable de ARNip con niveles aceptables de funcionalidad. En consecuencia, hay una necesidad de desarrollar criterios racionales para seleccionar ARNip con un nivel aceptable de funcionalidad, y para identificar ARNip que tienen este nivel de funcionalidad mejorada, así como también para identificar ARNip que son hiperfuncionales.

WO 03/056012 se refiere a un polinucleótido que comprende un promotor de ARN polimerasa III, una región que codifica un ARNip, y un elemento de terminación transcripcional que comprende cinco residuos de timina consecutivos. WO 03/056012 describe además vectores, células y animales transgénicos no humanos que comprenden los polinucleótidos así como también su uso en medicamentos para diversas condiciones.

WO 00/24885 describe oligonucleótidos no codificantes útiles para tratar un estado de enfermedad caracterizado por la inducción de p53.

Resumen de la invención

La presente invención se orienta a aumentar la eficiencia de la iARN, particularmente en los sistemas de mamíferos. En consecuencia, la presente invención proporciona kits, ARNip y métodos para aumentar la eficacia de los ARNip.

Particularmente, la presente invención proporciona una molécula de ARNip que comprende una región bicatenaria que consta de una cadena codificante y una cadena no codificante, en donde dicha cadena codificante comprende la secuencia GAGAAUAAUUUCACCCUUA (sec. con núm. de ident.: 512246).

Preferentemente la molécula de ARNip de la invención consiste de: (a) dicha región bicatenaria, y (b) sin bases colgantes o bases colgantes que contienen de uno a seis nucleótidos en el extremo 5' o 3' de la cadena codificante y/o la cadena no codificante. Preferentemente dicha región bicatenaria de la molécula de ARNip de la invención es de 19 - 30 pares de bases de longitud, por ejemplo 19 - 30 pares de bases de longitud, por ejemplo 19 pares de base de longitud. Preferentemente la molécula de ARNip de la invención tiene: (a) bases colgantes, o (b) no tiene bases colgantes. Preferentemente la molécula de ARNip de la invención es efectiva en el silenciamiento de tp53.

La presente invención proporciona además una molécula de ARNip de la invención para el uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal, por ejemplo en donde dicho método es un método de silenciamiento de tp53.

La presente invención proporciona además un método de silenciamiento de tp53 que comprende el uso de una molécula de ARNip de la invención, en donde dicho método no es un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia o un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal.

La presente invención todavía proporciona además una mezcla de al menos dos moléculas de ARNip, en donde la primera molécula de ARNip es una molécula de ARNip de la invención y cada molécula de ARNip adicional es efectiva en el silenciamiento de tp53.

Para una mejor comprensión de la presente invención junto con otras ventajas y modalidades adicionales, se hace referencia a la siguiente descripción tomada junto con los ejemplos, cuyo alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un modelo para las interacciones ARNip-RISC. RISC tiene la capacidad de interactuar con cualquiera de los extremos de la molécula de ARNip o miARN. Después de la unión, la doble cadena se desenrolla, y la diana relevante se identifica, se escinde, y se libera.

La Figura 2 es una representación de la funcionalidad de doscientos setenta dobles cadenas de ARNip que se generaron para ciclofilina humana, inhibidor humano de unión al diazepam (DB), y la luciferasa de luciérnaga.

La Figura 3a es una representación del efecto de silenciamiento de 30 ARNip en tres líneas celulares diferentes, HEK293, DU145, y Hela. **La Figura 3b** muestra la frecuencia de diferentes grupos funcionales (>95% de silenciamiento (negro), >80% de silenciamiento (gris), >50% de silenciamiento (gris oscuro), y <50% de silenciamiento (blanco)) basada en el contenido de GC. En los casos en que una barra dada está ausente a partir de un porcentaje de GC particular, no se identificaron ARNip para ese grupo en particular. **La Figura 3c** muestra la frecuencia de los diferentes grupos funcionales basada en la temperatura de fusión (Tm). Una vez más, cada grupo tiene cuatro divisiones diferentes: >95% (negro), >80% (gris), >50% (gris oscuro) y <50% (blanco) de silenciamiento.

La Figura 4 es una representación de un análisis estadístico que reveló las correlaciones entre el silenciamiento y cinco propiedades del ARNip relacionadas con la secuencia: (A) una A en la posición 19 de la cadena codificante, (B) una A en la posición 3 de la cadena codificante, (C) un U en la posición 10 de la cadena codificante, (D) una base distinta de G en la posición 13 de la cadena codificante, y (E) una base distinta de C en la posición 19 de la cadena codificante. Todas las variables se correlacionaron con el silenciamiento por ARNip de la luciferasa de luciérnaga y la ciclofilina humana. Los ARNip que cumplen el criterio se agrupan a la izquierda (Seleccionados) mientras que aquellos que no lo hacen, se agrupan a la derecha (Eliminados). El eje Y es "% de Silenciamiento del Control." Cada posición en el eje X representa un ARNip único.

Las Figuras 5 A y 5 B son representaciones de paneles de ARNip de luciferasa de luciérnaga y ciclofilina ordenados de acuerdo con la funcionalidad y los valores predichos con el uso de la Fórmula VIII. Los ARNip que se encuentran dentro del círculo representan aquellos que tienen valores de Fórmula VIII (SMARTscores™) por encima de cero. Los ARNip fuera de la zona indicada tienen valores de la Fórmula VIII calculados que están por debajo de cero. El eje Y es "Expresión (% Control). Cada posición en el eje X representa un ARNip único.

La Figura 6A es una representación del perfil promedio de estabilidad interna (AISP) obtenido de 270 ARNip tomados a partir de tres genes separados (ciclofilina B, DBI y luciferasa de luciérnaga). Los gráficos representan los valores AISP de ARNip altamente funcionales, funcionales y no funcionales. **La Figura 6B** es una comparación entre el AISP de ARNip de GFP de origen natural (cuadrados rellenos) y el AISP de ARNip de la ciclofilina B, DBI, y luciferasa que tienen propiedades de silenciamiento >90% (sin relleno) para la cadena no codificante. "DG" es el símbolo de ΔG , la energía libre.

La Figura 7 es un histograma que muestra las diferencias en la funcionalidad de las dobles cadenas tras la introducción de errores de apareamiento entre bases. El eje X muestra el error de apareamiento introducido en el ARNip y la posición en la que se introduce (*por ejemplo*, 8C->A revela que la posición 8 (que normalmente tiene una C) se ha cambiado por una A). El eje Y es el "% de silenciamiento (normalizado con el control)."

La Figura 8a es un histograma que muestra los efectos sobre la funcionalidad de la modificación por metilación 2'-O en 5' de la cadena codificante y la no codificante. **La Figura 8b** es un perfil de expresión que muestra una comparación de los efectos fuera de la diana de la cadena codificante para IGF1R-3 y 2'-O-metil IGF1R-3. Las moléculas fuera de la diana de la cadena codificante (cuadro blanco inferior) no se inducen cuando el extremo 5' de la cadena codificante se modifica con grupos 2'-O-metilo (cuadro blanco superior).

La Figura 9 muestra un gráfico de SMARTscores™ contra los valores de silenciamiento por iARN de más de 360 ARNip orientados contra 30 genes diferentes. Los ARNip a la derecha de la barra vertical representan aquellos ARNip que tienen SMARTscores™ deseables.

Las Figuras 10A - E comparan el iARN de cinco genes diferentes (SEAP, DBI, PLK, Luciferasa de Luciérnaga y Luciferasa de Renilla) mediante un número variable de ARNip seleccionados aleatoriamente y cuatro ARNip diseñados de manera racional (seleccionados por SMART) elegidos con el uso del algoritmo descrito en la Fórmula VIII. Adicionalmente, se reportó el iARN inducida por una mezcla de los cuatro ARNip seleccionados por SMART a

dos concentraciones diferentes (100 y 400 nM). **10F** es una comparación entre una mezcla de ARNip para EGFR seleccionados aleatoriamente (Mezcla 1) y una mezcla de ARNip para EGFR seleccionados por SMART (Mezcla 2). La Mezcla 1, S1-S4 y la mezcla 2 S1-S4 representan los miembros individuales que componen cada mezcla respectiva. Tenga en cuenta que los números de los ARNip aleatorios representan la posición del extremo 5' de la cadena codificante de la doble cadena. El eje Y representa el % de expresión del (de los) control (es). El eje X es la expresión en por ciento del control.

La Figura 11 muestra los resultados de Membrana de Western a partir de células tratadas con ARNip orientados contra doce genes diferentes implicados en la vía de endocitosis dependiente de clatrina (CHC, DynII, CALM, CLCa, CLCb, Eps15, Eps15R, Rab5a, Rab5b, Rab5c, subunidad β 2 de la AP-2 y EEA.1). Los ARNip se seleccionaron con el uso de la Fórmula VIII. "Mezcla" representa una mezcla de dobles cadenas 1-4. La concentración total de cada ARNip en la mezcla es 25 nM. La concentración total = $4 \times 25 = 100$ nM.

La Figura 12 es una representación de las capacidades de silenciamiento de genes de los ARNip seleccionados de manera racional orientados contra diez genes diferentes (ciclofilina humana y de ratón, C-myc, lamina A/C humana, QB (proteína central ubiquinol-citocromo c reductasa I), MEK1 y MEK2, ATE1 (proteína transferasa de arginil - ARNt), GAPDH y Eg5). El eje Y es la expresión en por ciento del control. Los números 1, 2, 3 y 4 representan los ARNip individuales seleccionados de manera racional. "Mezcla" representa una mezcla de los cuatro ARNip individuales.

La Figura 13 es la secuencia de los diez mejores ARNip de Bcl2 tal como se determinó mediante la Fórmula VIII. Las secuencias se enumeran de 5' a 3'.

La Figura 14 es la reducción de Bcl2 por los diez mejores ARNip a concentraciones de 100 nm. El eje Y representa la cantidad de expresión con relación al control no específico (ne) y la mezcla de transfección.

La Figura 15 representa un paseo funcional donde se prueban ARNip que comienzan en cada par de bases de una región del gen de la luciferasa para la capacidad de silenciar el gen de la luciferasa. El eje Y representa la expresión en por ciento con relación a un control. El eje X representa la posición de cada ARNip individual.

La Figura 16 es un histograma que demuestra la inhibición de la expresión del gen diana mediante mezclas de 2 y 3 dobles cadenas de ARNip tomados del paseo que se describe en la Figura 15. El eje Y representa la expresión en por ciento con relación al control. El eje X representa la posición del primer ARNip en mezclas de ARNip pareados, o en tríos. Por ejemplo, la primera mezcla pareada contiene los ARNip 1 y 3. La segunda mezcla pareada contiene los ARNip 3 y 5. La mezcla 3 (de mezclas pareadas) contiene los ARNip 5 y 7, y así sucesivamente.

La Figura 17 es un histograma que demuestra la inhibición de la expresión del gen diana mediante las mezclas 4 y 5 de dobles cadenas de ARNip. El eje Y representa la expresión en por ciento con relación a un control. El eje X representa la posición del primer ARNip en cada mezcla.

La Figura 18 es un histograma que demuestra la inhibición de la expresión del gen diana mediante ARNip que están separados de diez a veinte pares de bases. El eje Y representa la expresión en por ciento con relación a un control. El eje X representa la posición del primer ARNip en cada mezcla.

La Figura 19 muestra que las mezclas de ARNip (barra gris oscuro) trabajan tan bien (o mejor) que el mejor ARNip en la mezcla (barra gris claro). El eje Y representa la expresión en por ciento con relación a un control. El eje X representa la posición del primer ARNip en cada mezcla.

La Figura 20 muestra que la combinación de varios ARNip semifuncionales (gris oscuro) resulta en una mejora significativa de la inhibición de la expresión génica sobre los ARNip individuales (semifuncionales, gris claro). El eje Y representa la expresión en por ciento con relación a un control.

La Figura 21 muestra las mezclas (Genoteca, Lib) y los ARNip individuales en la inhibición de la expresión del gen de la beta-galactosidasa, luciferasa de Renilla y SEAP (fosfatasa alcalina). Los números en el eje X indican la posición del nucleótido más hacia el 5' de la cadena codificante de la doble cadena. El eje Y representa la

expresión de cada gen en por ciento con relación a un control. Las genotecas contienen ARNip que comienzan en los siguientes nucleótidos: Seap: Lib 1: 206, 766, 812,923, Lib 2: 1117, 1280, 1300, 1487, Lib 3: 206, 766, 812, 923, 1117, 1280, 1300,1487, Lib 4: 206, 812, 1117, 1300, Lib 5: 766, 923, 1280, 1487, Lib 6: 206, 1487; Bgal: Lib 1: 979, 1339, 2029, 2590, Lib 2: 1087,1783,2399,3257, Lib 3: 979, 1783, 2590, 3257, Lib 4: 979, 1087, 1339, 1783, 2029, 2399,2590,3257, Lib 5: 979, 1087, 1339, 1783, Lib 6: 2029,2399,2590,3257; Renilla: Lib 1: 174,300,432,568, Lib 2: 592, 633, 729,867, Lib 3: 174, 300, 432, 568, 592, 633,729,867, Lib 4: 174, 432, 592, 729, Lib 5: 300,568,633,867, Lib 6: 592,568.

La **Figura 22** muestra los resultados de un ensayo de internalización de EGFR y TfnR cuando se realizan reducciones de genes únicos. El eje Y representa la internalización en por ciento con relación al control.

La **Figura 23** muestra los resultados de un ensayo de internalización de EGFR y TfnR cuando se apagan múltiples genes (*por ejemplo* Rab5a, b, c). El eje Y representa la internalización en por ciento con relación al control.

La **Figura 24** muestra la reducción simultánea de cuatro genes diferentes. Los ARNip orientados contra G6PD, GAPDH, PLK, y UBQ se introdujeron simultáneamente en las células. Veinticuatro horas más tarde, se cosecharon los cultivos y se ensayaron para los niveles de ARNm diana para cada uno de los cuatro genes. Se hace una comparación entre las células transfectadas con ARNip individuales frente a una mezcla de ARNip orientados contra los cuatro genes.

La **Figura 25** muestra la funcionalidad de diez ARNip a concentraciones de 0.3 nM.

Descripción detallada

Definiciones

A menos que se indique de cualquier otra forma, los siguientes términos y frases tendrán los significados que se proporcionan más abajo:

ARNip.

El término "ARNip" se refiere a dobles cadenas de ARN inhibitorios pequeños que inducen la vía de interferencia por ARN (iARN). Estas moléculas pueden variar en longitud (generalmente entre 18-30 pares de bases) y contener diversos grados de complementariedad a su ARNm diana en la cadena no codificante. Algunos, pero no todos los ARNip, tienen bases colgantes no apareadas en el extremo 5' o 3' de la cadena codificante y/o la cadena no codificante. El término "ARNip" incluye dobles cadenas de dos cadenas separadas, así como también cadenas únicas que pueden formar estructuras de horquilla que comprenden una región bicatenaria.

Los ARNip pueden dividirse en cinco (5) grupos (no funcionales, semifuncionales, funcionales, altamente funcionales, e hiperfuncionales) basado en el nivel o grado de silenciamiento que inducen en las líneas celulares cultivadas. Como se usa en la presente, estas definiciones se basan en un conjunto de condiciones en las que el ARNip se transfecta en dicha línea celular a una concentración de 100 nM y el nivel de silenciamiento se prueba en un tiempo de alrededor de 24 horas después de la transfección, y que no exceda las 72 horas después de la transfección. En este contexto, "ARNip no funcionales" se definen como aquellos ARNip que inducen menos de 50% (<50%) de silenciamiento de la molécula diana. "ARNip semifuncionales" inducen de 50-79% de silenciamiento de la molécula diana. "ARNip funcionales" son moléculas que inducen 80-95% de silenciamiento génico. "ARNip altamente funcionales" son moléculas que inducen más del 95% de silenciamiento génico. "ARNip hiperfuncionales" son una clase especial de moléculas. Para los propósitos de este documento, los ARNip hiperfuncionales se definen como aquellas moléculas que: (1) inducen más del 95% de silenciamiento de una diana específica cuando se transfectan a concentraciones subnanomolares (*es decir*, menos de un nanomolar); y/o (2) inducen niveles funcionales (o mejores) de silenciamiento durante más de 96 horas. Estas funcionalidades relativas (aunque no pretenden ser absolutas) pueden usarse para comparar los ARNip de una molécula diana en particular para aplicaciones tales como genómica funcional, la identificación de moléculas diana y la terapéutica.

miARN.

El término "miARN" se refiere a MicroARN.

Silenciamiento génico

5 La frase "silenciamiento génico" se refiere a un proceso mediante el cual la expresión de un producto génico específico se disminuye o se atenúa. El silenciamiento génico puede tener lugar mediante una variedad de vías. A menos que se especifique de cualquier otra forma, como se usa en la presente, el silenciamiento génico se refiere a la disminución de la expresión del producto de un gen como resultado de la interferencia por ARN (iARN), una vía definida, aunque caracterizada parcialmente por la que los ARN inhibidores pequeños (ARNip) actúan concertadamente con proteínas del huésped (*por ejemplo* el complejo silenciador inducido por ARN, RISC) para degradar el ARN mensajero (ARNm) en una manera dependiente de la secuencia. El nivel de silenciamiento génico puede medirse mediante una variedad de medios, que incluyen, pero sin limitarse a, la medición de los niveles del transcrito mediante análisis por Membrana de Northern, técnicas de B-ADN, construcciones reporteras sensibles a la transcripción, perfiles de expresión (*por ejemplo* chips de ADN), y tecnologías relacionadas. Alternativamente, el nivel de silenciamiento puede medirse mediante la evaluación del nivel de la proteína codificada por un gen específico. Esto puede lograrse mediante la realización de un número de estudios que incluyen análisis de Western, la medición de los niveles de expresión de una proteína reportera que tiene *por ejemplo* propiedades fluorescentes (*por ejemplo* GFP) o actividad enzimática (*por ejemplo* fosfatasas alcalinas), u otros procedimientos varios.

Transfección

20 El término "transfección" se refiere a un proceso mediante el cual los agentes se introducen en una célula. La lista de agentes que pueden transfectarse es grande e incluye, pero sin limitarse a, ARNip, secuencias codificantes y/o no codificantes, ADN que codifica uno o más genes y se organiza en un plásmido de expresión, proteínas, fragmentos de proteínas, y más. Existen múltiples métodos para la transfección de agentes en una célula que incluyen, pero sin limitarse a, electroporación, transfecciones basadas en fosfato cálcico, transfecciones basadas en DEAE-dextrano, transfecciones basadas en lípidos, transfecciones basadas en conjugados moleculares (*por ejemplo* conjugados de polilisina-ADN), microinyección y otros.

Diana

30 El término "diana" se usa en una variedad de formas diferentes a lo largo de este documento y se define por el contexto en el que se usa. "ARNm diana" se refiere a un ARN mensajero contra el cual puede orientarse un ARNip dado. "Secuencia diana" y "sitio diana" se refieren a una secuencia dentro del ARNm a la que la cadena codificante de un ARNip muestra grados variables de homología y la cadena no codificante exhibe grados variables de complementariedad. El término "diana del ARNip" puede referirse al gen, ARNm, o a la proteína contra la que se orienta un ARNip. De manera similar "silenciamiento de la diana" puede referirse al estado de un gen, o del ARNm o proteína correspondientes.

Silenciamiento fuera de la diana o interferencia fuera de la diana

40 Las frases "silenciamiento fuera de la diana" e "interferencia fuera de la diana" se definen como la degradación de otro ARNm que no es el ARNm diana debido a la superposición y/u homología parcial con mensajes secundarios de ARNm.

SMARTscore™

45 El término "SMARTscore™" se refiere a un número determinado mediante la aplicación de cualquiera de las Fórmulas I - Fórmula IX a una secuencia de ARNip dada. El término "seleccionado por SMART" o "seleccionado de manera racional" o "selección racional" se refiere a los ARNip que se seleccionaron en base a sus SMARTscores™.

Complementariedad

50 El término "complementariedad" se refiere a la capacidad de los polinucleótidos para formar pares de bases entre ellos. Los pares de bases se forman típicamente por enlaces de hidrógeno entre las unidades de nucleótidos en cadenas antiparalelas de polinucleótidos. Las cadenas complementarias de polinucleótidos pueden aparearse en la forma de Watson-Crick (*por ejemplo*, A a T, A a U, C a G), o de cualquier otra manera que permita la formación de dobles cadenas. Como conocen aquellos con experiencia en la técnica, cuando se usa ARN en lugar de ADN, la base que se considera complementaria a la adenosina es uracilo en lugar de timina. Sin embargo, cuando un U se denota en el contexto de la presente invención, la capacidad de sustituir una T está implícita, a menos que se indique de cualquier otra forma.

La complementariedad perfecta o 100% de complementariedad se refiere a la situación en la que cada unidad de nucleótido de una cadena de polinucleótidos puede formar enlaces de hidrógeno con una unidad de nucleótido de una segunda cadena de polinucleótidos. Menos que complementariedad perfecta se refiere a la situación en la que algunas, pero no todas las unidades de nucleótidos de dos cadenas, pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí. Por ejemplo, para dos de 20 mers, si sólo dos pares de bases en cada cadena pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí, las cadenas de polinucleótidos exhiben 10% de complementariedad. En el mismo ejemplo, si 18 pares de bases en cada cadena pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí, las cadenas de polinucleótidos exhiben 90% de complementariedad. "Complementariedad sustancial" se refiere a cadenas de polinucleótidos que exhiben 79% o más de complementariedad, excluyendo las regiones de las cadenas de polinucleótidos, tales como los colgantes, que se seleccionan con el fin de ser no complementarias. ("Similitud sustancial" se refiere a cadenas de polinucleótidos que presentan 79% o más de similitud, excluyendo las regiones de las cadenas de polinucleótidos, tales como los colgantes, que se seleccionan con el fin de no ser similares.) Así, por ejemplo, dos polinucleótidos de 29 unidades de nucleótidos cada uno, en donde cada uno comprende un di-dT en el extremo 3' de tal manera que la región bicatenaria se extiende por 27 bases, y en donde 26 de las 27 bases de la región bicatenaria en cada cadena son complementarias, son sustancialmente complementarias ya que son el 96.3% complementarias al excluir los colgantes di-dT.

Deoxinucleótido

El término "deoxinucleótido" se refiere a un nucleótido o polinucleótido que carece de un grupo hidroxilo (grupo OH) en la posición 2' y/o 3' de una porción de azúcar. En su lugar, tiene un hidrógeno unido al carbono 2' y/o 3'. Dentro de una molécula de ARN que comprende uno o más deoxinucleótidos, "deoxinucleótido" se refiere a la carencia de un grupo OH en la posición 2' de la porción de azúcar, que tiene en su lugar un hidrógeno unido directamente al carbono 2'.

Deoxirribonucleótido

Los términos "deoxirribonucleótido" y "ADN" se refieren a un nucleótido o polinucleótido que comprende al menos una porción de azúcar que tiene un H, en lugar de un OH, en su posición 2' y/o 3'.

Sustancialmente similar

La frase "sustancialmente similar" se refiere a una similitud de al menos 90% con respecto a la identidad de las bases de la secuencia.

Región Bicatenaria

La frase "región bicatenaria" se refiere a la región en dos polinucleótidos complementarios o sustancialmente complementarios que forman pares de bases entre sí, ya sea por apareamiento de bases de Watson-Crick o que de cualquier otra manera permita la formación de una doble cadena estable entre las cadenas de polinucleótidos que son complementarias o sustancialmente complementarias. Por ejemplo, una cadena de polinucleótidos que tiene 21 unidades de nucleótidos puede aparearse con otro polinucleótido de 21 unidades de nucleótidos, sin embargo sólo 19 bases en cada cadena son complementarias o sustancialmente complementarias, de tal manera que la "región bicatenaria" tiene 19 pares de bases. Las bases restantes pueden, por ejemplo, existir como colgantes 5' y 3'. Más aún, dentro de la región bicatenaria, no se requiere un 100% de complementariedad; la complementariedad sustancial es permisible dentro de una región bicatenaria. Complementariedad sustancial se refiere a 79% o más de complementariedad. Por ejemplo, un error de apareamiento en una región bicatenaria que consiste de 19 pares de bases resulta en un 94.7 % de complementariedad, que rinde una región bicatenaria sustancialmente complementaria.

Nucleótido

El término "nucleótido" se refiere a un ribonucleótido o un deoxirribonucleótido o forma modificada de ellos, así como también un análogo de ellos. Los nucleótidos incluyen especies que comprenden purinas, *por ejemplo*, adenina, hipoxantina, guanina, y sus derivados y análogos, así como también pirimidinas, *por ejemplo*, citosina, uracilo, timina, y sus derivados y análogos.

Los análogos de nucleótidos incluyen nucleótidos que tienen modificaciones en la estructura química de la base, azúcar y/o fosfato, que incluyen, pero sin limitarse a, modificaciones en la posición 5 de la pirimidina, modificaciones en la posición 8 de la purina, modificaciones en aminas exocíclicas de citosina, y la sustitución de 5-bromo-uracilo; y modificaciones en la posición 2' del azúcar, que incluyen pero sin limitarse a, ribonucleótidos modificados en el azúcar en donde el 2'-OH se

sustituye por un grupo tal como un H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, o CN, en donde R es una porción alquilo. Se entiende además que los análogos de nucleótidos incluyen nucleótidos con bases tales como mosina, queuosina, xantina, azúcares tales como 2'-metil ribosa, enlaces fosfodiéster no naturales tales como metilfosfonatos, fosforotioatos y péptidos.

5 Las bases modificadas se refieren a las bases de nucleótidos tales como, por ejemplo, adenina, guanina, citosina, timina, uracilo, xantina, mosina, y queuosina que se modificaron mediante la sustitución o adición de uno o más átomos o grupos. Algunos ejemplos de tipos de modificaciones que pueden comprender nucleótidos que se modifican con respecto a los
 10 restos de las bases incluyen, pero sin limitarse a, bases alquiladas, halogenadas, tioladas, aminadas, amidadas, o acetiladas, individualmente o en combinación. Los ejemplos más específicos incluyen, por ejemplo, 5-propiniluridina, 5-propinilcitidina, 6-metiladenina, 6-metilguanina, N,N,- dimetiladenina, 2-propiladenina, 2-propilguanina, 2-aminoadenina, 1-metilinosina, 3-metiluridina, 5-metilcitidina, 5-metiluridina y otros nucleótidos que tienen una modificación en la posición 5, 5-(2-amino)propil uridina, 5- halocitidina, 5-halouridina, 4-acetilcitidina, 1-metiladenosina, 2-metiladenosina, 3-metilcitidina, 6-metiluridina, 2-metilguanosina, 7-metilguanosina, 2,2-dimetilguanosina, 5-metilaminoetiluridina, 5-metiloxiuridina,
 15 deazanucleótidos tales como 7-deaza-adenosina, 6-azouridina, 6-azocitidina, 6-azotimidina, 5-metil-2-tiouridina, otras tio-bases tales como 2-tiouridina y 4-tiouridina y 2-tiocitidina, dihidrouridina, pseudouridina, queuosina, arqueosina, naftilo y grupos naftilo sustituidos, purinas y pirimidinas O- y N- alquiladas tales como N6-metiladenosina, 5-metilcarbonilmetiluridina, ácido uridina 5-oxiacético, piridina-4-ona, piridina-2-ona, fenilo y grupos fenilo modificados tales como aminofenol o 2,4,6-trimetoxi benceno, citosinas modificadas que actúan como nucleótidos de enganche para G, adeninas y guaninas sustituidas en 8, uracilos y timinas sustituidas en 5, azapirimidinas, nucleótidos carboxihidroalquil, nucleótidos
 20 carboxialquilaminoalquil, y nucleótidos alquilcarbonilalquilados. Los nucleótidos modificados incluyen además aquellos nucleótidos que se modifican con respecto al porción de azúcar, así como también nucleótidos que tienen azúcares o análogos de ellos que no son ribosilo. Por ejemplo, las porciones de azúcar pueden ser, o basarse en, manosas, arabinosas, glucopiranosas, galactopiranosas, 4'-tiorribosa y otros azúcares, heterociclos, o carbociclos.

25 El término nucleótido significa además que incluye lo que se conoce en la materia como bases universales. A modo de ejemplo, las bases universales incluyen, pero sin limitarse a 3-nitropirrol, 5-nitroindol, o nebularina. El término "nucleótido" significa además que incluye el N3' a P5'-fosforamido, que resulta de la sustitución de un oxígeno ribosil 3' con un grupo amino.

30 Más aún, el término nucleótido incluye además aquellas especies que tienen un marcaje detectable, tal como por ejemplo una porción radiactiva o fluorescente, o un marcaje de masa unido al nucleótido.

Polinucleótido

35 El término "polinucleótido" se refiere a polímeros de nucleótidos, e incluye pero no se limita a ADN, ARN, híbridos ADN/ARN que incluyen cadenas de polinucleótidos de porciones de desoxirribosilo y porciones de ribosilo que se alternan de manera regular y/o irregular (*es decir*, en donde las unidades de nucleótidos alternas tienen un -OH, después un -H, después un -OH, después un -H, y así sucesivamente en la posición 2' de una porción de azúcar), y modificaciones de estos tipos de polinucleótidos, en donde se incluyen la unión de diversas entidades o porciones a las unidades de nucleótidos en cualquier
 40 posición.

Polirribonucleótido

45 El término "polirribonucleótido" se refiere a un polinucleótido que comprende dos o más ribonucleótidos modificados o sin modificar y/o sus análogos. El término "polirribonucleótido" se usa de manera intercambiable con el término "oligorribonucleótido".

Ribonucleótido y ácido ribonucleico

50 El término "ribonucleótido" y la frase "ácido ribonucleico" (ARN), se refiere a un nucleótido modificado o no modificado o polinucleótido que comprende al menos una unidad de ribonucleótido. Una unidad de ribonucleótido comprende un grupo hidroxilo unido a la posición 2' de una porción de ribosilo que tiene una base nitrogenada unida por enlace N-glicosídico en la posición 1' de una porción de ribosilo, y una porción que permite el enlace con otro nucleótido o imposibilita el enlace.

55 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención está orientada a mejorar la eficiencia del silenciamiento génico mediante ARNip. A través de la inclusión de múltiples secuencias de ARNip que están dirigidos a un gen particular y/o la selección de una secuencia de ARNip sobre la base de ciertos criterios definidos, puede alcanzarse una eficiencia mejorada.

- 5 La presente invención se describirá ahora en relación con modalidades preferidas. Estas modalidades se presentan con el fin de ayudar en la comprensión de la presente invención y no pretenden, y no deben interpretarse, para limitar la invención de ninguna manera. Todas las alternativas, modificaciones y equivalentes que pueden llegar a ser evidentes para los expertos al leer esta descripción se incluyen dentro del espíritu y alcance de la presente invención.
- 10 Por otra parte, esta descripción no es una introducción a la interferencia de ARN. Los conceptos básicos conocidos por los expertos en la técnica no se exponen en detalle.

Optimización del ARNip

- 15 La molécula de ARNip de la presente invención se identificó con el uso de un método para mejorar la efectividad del silenciamiento génico para usar para silenciar un gen particular a través de la selección de un ARNip óptimo. Un ARNip seleccionado de acuerdo con este método puede usarse individualmente, o con uno o más de otros ARNip, cada uno de los cuales puede seleccionarse o no por este criterio con el fin de maximizar su eficiencia.
- 20 El grado al cual es posible seleccionar un ARNip para un ARNm dado que maximiza estos criterios dependerá de la secuencia del ARNm en sí. Sin embargo, los criterios de selección serán independientes de la secuencia diana. De acuerdo con este método, un ARNip se selecciona para un gen dado mediante el uso de un diseño racional. Dicho esto, el diseño racional puede describirse en una variedad de maneras. Diseño racional es, en términos más simples, la aplicación de un conjunto probado de criterios que mejoran la probabilidad de identificar un ARNip funcional o hiperfuncional. En un método,
- 25 un ARNip diseñado de manera racional puede identificarse mediante la maximización de uno o más de los siguientes criterios:
1. Un bajo contenido de GC, preferentemente entre aproximadamente 30 -52%.
 2. Al menos 2, preferentemente al menos 3 bases A o U en las posiciones 15- 19 del ARNip en la cadena codificante.
 - 30 3. Una base A en la posición 19 de la cadena codificante.
 4. Una base A en la posición 3 de la cadena codificante.
 5. Una base U en la posición 10 de la cadena codificante.
 6. Una base A en la posición 14 de la cadena codificante.
 7. Una base distinta de C en la posición 19 de la cadena codificante.
 - 35 8. Una base distinta de G en la posición 13 de la cadena codificante.
 9. Una T_m, que se refiere al carácter de la repetición interna que resulta en estructuras inter o intramoleculares de una cadena de la doble cadena, que no es preferentemente estable a más de 50°C, con mayor preferencia no estable a más de 37°C, aún con mayor preferencia no estable a más de 30°C y con la máxima preferencia no estable a más de 20°C.
 - 40 10. Una base distinta de U en la posición 5 de la cadena codificante.
 11. Una base distinta de A en la posición 11 de la cadena codificante.

45 Los criterios 5, 6, 10 y 11 son criterios menores, sin embargo son deseables. En consecuencia, preferentemente un ARNip va a satisfacer tantos criterios mencionados anteriormente como sea posible, con mayor preferencia al menos 1-4 y 7-9, y con la máxima preferencia todos los criterios.

50 Con respecto a los criterios, el contenido de GC, así como también un alto número de UA en las posiciones 15-19, pueden ser importantes para la facilidad del desenrollado de la doble cadena de ARNip bicatenario. El desenrollado de la doble cadena ha demostrado ser crucial para la funcionalidad del ARNip *in vivo*.

55 Con respecto al criterio 9, la estructura interna se mide en términos de la temperatura de fusión de la cadena única de ARNip, que es la temperatura a la que el 50% de las moléculas serán desnaturalizadas. Con respecto a los criterios de 2-8 y 10-11, las posiciones se refieren a posiciones de la secuencia en la cadena codificante, que es la cadena que es idéntica a la del ARNm.

En una modalidad preferida, se cumplen al menos los criterios 1 y 8. En otra modalidad preferida, se cumplen al menos los criterios 7 y 8. En todavía otra modalidad preferida, se cumplen al menos los criterios 1, 8 y 9.

5 Debe señalarse que todos los criterios mencionados anteriormente con respecto a aspectos específicos de la posición de la secuencia son con respecto al extremo 5' de la cadena codificante. Se hace referencia a la cadena codificante, debido a que la mayoría de las bases de datos contienen información que describe la información del ARNm. Debido a que de acuerdo con la presente invención una cadena puede ser de 18 a 30 bases de longitud, y los criterios mencionados anteriormente asumen una cadena de 19 pares de bases de longitud, es importante mantener los criterios mencionados anteriormente aplicables a las bases correctas.

10 Cuando sólo hay 18 bases, el par de bases que no está presente es el par de bases que se encuentra en el extremo 3' de la cadena codificante. Cuando hay de veinte a treinta bases presentes, entonces se añaden bases adicionales en el extremo 5' de la cadena codificante y ocupan las posiciones 1 a 11. En consecuencia, con respecto a la sec. con núm. de indent.: 0001. NNANANNNNUCNAANNNA y sec. con núm. de indent.: 0028. GUCNNANANNNNUCNAANNNA, ambos tendrían A en la posición 3, A en la posición 5, U en la posición 10, C en la posición 11, A y posición 13, A y posición 14 y A en la posición 19. Sin embargo, la sec. con núm. de indent.: 0028 también tendría C en la posición -1, U en la posición -2 y G en la posición -3.

15 Para un ARNip de 19 pares de base, una secuencia óptima de una de las cadenas puede representarse más abajo, donde N es cualquier base, A, C, G, o U:

20 Sec. con núm. de indent.: 0001. NNANANNNNUCNAANNNA

Sec. con núm.de ident. 0002 NNANANNNNUGNAANNNA

Sec. con núm.de ident. 0003 NNANANNNNUUNAANNNA

Sec. con núm.de ident. 0004 NNANANNNNUCNCANNNA

Sec. con núm.de ident. 0005 NNANANNNNUGNCANNNA

Sec. con núm.de ident. 0006 NNANANNNNUUNCANNNA

25 Sec. con núm.de ident. 0007 NNANANNNNUCNUANNNA

Sec. con núm.de ident. 0008 NNANANNNNUGNUANNNA

Sec. con núm.de ident. 0009 NNANANNNNUUNUANNNA

Sec. con núm.de ident. 0010 NNANCNNNNUCNAANNNA

Sec. con núm.de ident. 0011 NNANCNNNNUGNAANNNA

30 Sec. con núm.de ident. 0012 NNANCNNNNUUNAANNNA

Sec. con núm.de ident. 0013 NNANCNNNNUCNCANNNA

Sec. con núm.de ident. 0014 NNANCNNNNUGNCANNNA

Sec. con núm.de ident. 0015 NNANCNNNNUUNCANNNA

Sec. con núm.de ident. 0016 NANCNNNNUCNUANNNA

35 Sec. con núm.de ident. 0017 NNANCNNNNUGNUANNNA

Sec. con núm.de ident. 0018 NNANCNNNNUUNUANNNA

Sec. con núm.de ident. 0019 NNANGNNNNUCNAANNNA

Sec. con núm.de ident. 0020 NNANGNNNNUGNAANNNA

Sec. con núm.de ident. 0021 NNANGNNNNUUNAANNNA

40 Sec. con núm.de ident. 0022 NNANGNNNNUCNCANNNA

Sec. con núm.de ident. 0023 NNANGNNNNUGNCANNNA

Sec. con núm.de ident. 0024 NNANGNNNNUUNCANNNA

Sec. con núm.de ident. 0025 NNANGNNNNUCNUANNNA

45 Sec. con núm.de ident. 0026 NNANGNNNNUGNUANNNA

Sec. con núm.de ident. 0027 NNANGNNNNUNUANNNA

En una modalidad, la secuencia usada como un ARNip se selecciona eligiendo el ARNip con la puntuación más alta de acuerdo con uno de los siguientes siete algoritmos que se representan mediante las Fórmulas I - VII:

50 Fórmula I

$$\text{Funcionalidad relativa de ARNip} = -(GC/3) + (AU_{15-19}) - (Tm_{20^{\circ}C}) * 3 - (C_{19}) + (A_{19}) * 2 + (A_3) + (U_{10}) + (A_{14}) - (U_5) - (A_{11})$$

Fórmula II

$$\text{Funcionalidad relativa de ARNip} = -(GC/3) - (AU_{15-19}) * 3 - (G_{13}) * 3 - (C_{19}) + (A_{19}) * 2 + (A_3)$$

55 Fórmula III

$$\text{Funcionalidad relativa de ARNip} = -(GC/3) + (AU_{15-19}) - (Tm_{20^{\circ}C}) * 3$$

Fórmula IV

Funcionalidad relativa de ARNip = $-GC/27 + (AU_{15-19})/2 - (Tm_{20°C}) * 2 - (G_{13}) * 3 - (C_{19}) + (A_{19}) * 2 + (A_3) + (U_{10}) + (A_{14}) - (U_5) - (A_{11})$

5

Fórmula V

Funcionalidad relativa de ARNip = $-(G_{13}) * 3 - (C_{19}) + (A_{19}) * 2 + (A_3) + (U_{10}) + (A_{14}) - (U_5) - (A_{11})$

10

Fórmula VI

Funcionalidad relativa de ARNip = $-(G_{13}) * 3 - (C_{19}) + (A_{19}) * 2 + (A_3)$

15

Fórmula VII

Funcionalidad relativa de ARNip = $-(GC/2) + (AU_{15-19})/2 - (Tm_{20°C}) * 1 - (G_{13}) * 3 - (C_{19}) + (A_{19}) * 3 + (A_3) * 3 + (U_{10})/2 + (A_{14})/2 - (U_5)/2 - (A_{11})/2$

En las Fórmulas I - VII:

en donde $A_{19} = 1$ si A es la base en la posición 19 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0,

$AU_{15-19} = 0 - 5$ dependiendo del número de bases A o U en la cadena codificante en las posiciones 15-19;

$G_{13} = 1$ si G es la base en la posición 13 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;

$C_{19} = 1$ si C es la base en la posición 19 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;

GC= el número de las bases G y C en toda la cadena codificante;

$Tm_{20°C} = 1$ si el Tm es mayor que 20°C;

$A_3 = 1$ si A es la base en la posición 3 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;

$U_{10} = 1$ si U es la base en la posición 10 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;

$A_{14} = 1$ si A es la base en la posición 14 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;

$U_5 = 1$ si U es la base en la posición 5 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0; y

$A_{11} = 1$ si A es la base en la posición 11 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0.

Las Fórmulas I -VII proporcionan información relativa respecto a la funcionalidad. Cuando se comparan los valores de dos secuencias de una fórmula dada, la funcionalidad relativa se comprueba; un número positivo más alto indica una funcionalidad mayor. Por ejemplo, en muchas aplicaciones es beneficioso un valor de 5 o mayor.

Además, en muchas aplicaciones, más de una de estas fórmulas podría proporcionar información útil en cuanto a la funcionalidad relativa de secuencias potenciales de ARNip. Sin embargo, es beneficioso tener más de un tipo de fórmula, debido a que no todas las fórmulas serán capaces de ayudar a diferenciar entre las secuencias potenciales de ARNip. Por ejemplo, en un ARNm de GC particularmente alto, las fórmulas que tienen en cuenta este parámetro no serían útiles y la aplicación de las fórmulas que carecen de los elementos GC (*por ejemplo*, las fórmulas V y VI) podría proporcionar un mayor conocimiento de la funcionalidad de la doble cadena. De manera similar, la Fórmula II puede usarse en situaciones en las que no se observan estructuras de horquilla en las dobles cadenas, y la Fórmula IV puede ser aplicable para las secuencias que tienen un contenido de AU más alto. Así, puede considerarse una secuencia particular a la luz de más de uno o aún todos estos algoritmos para obtener la mejor diferenciación entre las secuencias. En algunos casos, la aplicación de un algoritmo dado puede identificar un número inusualmente alto de secuencias potenciales de ARNip, y en esos casos, puede ser adecuado volver a analizar esa secuencia con un segundo algoritmo que es, por ejemplo, más estricto. Alternativamente, es concebible que el análisis de una secuencia con una fórmula dada produzca secuencias de ARNip inaceptables (*es decir*, SMARTscores™ más bajos). En este caso, puede ser adecuado volver a analizar las secuencias con un segundo algoritmo que es, por ejemplo, menos estricto. Todavía en otros casos, el análisis de una secuencia única con dos fórmulas separadas puede dar lugar a resultados contradictorios (*es decir* una fórmula genera un conjunto de ARNip con altos SMARTscores™, mientras que la otra fórmula identifica un conjunto de ARNip con SMARTscores™ más bajos). En estos casos, podría ser necesario determinar cuál es(son) el(los) factor(es) ponderado(s) (*por ejemplo*, contenido de GC) que contribuyen a la discrepancia y evaluar la secuencia para decidir si estos factores deben incluirse o no. Alternativamente, la secuencia podría analizarse mediante un tercero, cuarto, o quinto algoritmo para identificar un conjunto de ARNip diseñado de manera racional.

Los criterios mencionados anteriormente son particularmente ventajosos cuando se usan en combinación con las técnicas de mezclado tal como se representa en la Tabla I:

Tabla I

Criterio	Probabilidad Funcional					
	Oligos			Mezclas		
	>95%	>80%	<70%	>95%	>80%	<70%
Actual	33.0	50.0	23.0	79.5	97.3	0.3
Nueva	50.0	88.5	8.0	93.8	99.98	0.005
(GC)	28.0	58.9	36.0	72.8	97.1	1.6

5 El término "actual" se refiere a los parámetros convencionales de ARNip de Tuschl (Elbashir, S.M. y otros (2002) "Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs" Methods 26: 199-213). "Nuevo" se refiere a los parámetros de diseño descritos en las Fórmulas I-VII. "GC" se refiere a criterios que seleccionan ARNip únicamente sobre la base del contenido de GC.

10 Como se indica en la Tabla I, cuando se eligen más dobles cadenas de ARNip funcionales, los ARNip que producen <70% de silenciamiento caen del 23% al 8% y el número de dobles cadenas de ARNip que producen >80% de silenciamiento se eleva del 50% al 88.5%. Más aún, de las dobles cadenas de ARNip con >80% de silenciamiento, una porción más grande de estos ARNip en realidad silencia el >95% de la expresión de la diana (los nuevos criterios aumentan la porción de 33% a 50%). El uso de estos nuevos criterios en ARNip mezclados, muestra que, con la mezcla, la cantidad de silenciamiento >95% aumenta de 79.5% a 93.8% y prácticamente elimina cualquier mezcla de ARNip de menos de 70% de silenciamiento.

15 La Tabla II muestra de manera similar los resultados particularmente beneficiosos de la mezcla en combinación con los criterios mencionados anteriormente. Sin embargo, la Tabla II, que tiene en cuenta cada una de las variables antes mencionadas, demuestra aún un mayor grado de mejora en la funcionalidad.

Tabla II

	Probabilidad Funcional					
	Oligos			Mezclas		
	Funcionales	Promedio	No funcionales	Funcionales	Promedio	No funcionales
Selección Aleatoria	20	40	50	67	97	3
Criterio 1	52	99	0.1	97	93	0.0040
Criterio 4	89	99	0.1	99	99	0.0000

20 Los términos "funcional", "promedio" y "no funcionales" se refieren a ARNip que exhiben >80%, >50%, y <50% de funcionalidad respectivamente. Los criterios 1 y 4 se refieren a criterios específicos descritos anteriormente.

25 Los algoritmos descritos anteriormente pueden usarse con o sin un programa informático que permite la introducción de la secuencia del ARNm y saca automáticamente el ARNip óptimo. El programa informático puede, por ejemplo, ser accesible desde un terminal local o un ordenador personal, a través de una red interna o a través de Internet.

30 Adicionalmente a las fórmulas anteriores, pueden usarse algoritmos más detallados para la selección de ARNip. Preferentemente, se selecciona al menos un ARN bicatenario de entre 18 y 30 pares de bases de tal manera que se optimiza de acuerdo con una fórmula seleccionada de:

35 **Fórmula VIII:** $(-14)*G_{13} - 13*A_1 - 12*U_7 - 11*U_2 - 10*A_{11} - 10*U_4 - 10*C_3 - 10*C_5 - 10*C_6 - 9*A_{10} - 9*U_9 - 9*C_{18} - 8*G_{10} - 7*U_1 - 7*U_{16} - 7*C_{17} - 7*C_{19} + 7*U_{17} + 8*A_2 + 8*A_4 + 8*A_5 + 8*C_4 + 9*G_8 + 10*A_7 + 10*U_{18} + 11*A_{19} + 11*C_9 + 15*G_1 + 18*A_3 + 19*U_{10} - T_m - 3*(GC_{total}) - 6*(GC_{15-19}) - 30*X ; y$

Fórmula IX: $(14.1)*A_3 + (14.9)*A_6 + (17.6)*A_{13} + (24.7)*A_{19} + (14.2)*U_{10} + (10.5)*C_9 + (23.9)*G_1 + (16.3)*G_2 + (-12.3)*A_{11} + (-19.3)*U_1 + (-12.1)*U_2 + (-11)*U_3 + (-15.2)*U_{15} + (-11.3)*U_{16} + (-11.8)*C_3 + (-17.4)*C_6 + (-10.5)*C_7 + (-13.7)*G_{13} + (-25.9)*G_{19} - T_m - 3*(GC_{total}) - 6*(GC_{15-19}) - 30*X$

en donde

- $A_1 = 1$ si A es la base en la posición 1 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $A_2 = 1$ si A es la base en la posición 2 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $A_3 = 1$ si A es la base en la posición 3 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 5 $A_4 = 1$ si A es la base en la posición 4 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $A_5 = 1$ si A es la base en la posición 5 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $A_6 = 1$ si A es la base en la posición 6 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $A_7 = 1$ si A es la base en la posición 7 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $A_{10} = 1$ si A es la base en la posición 10 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 10 $A_{11} = 1$ si A es la base en la posición 11 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $A_{13} = 1$ si A es la base en la posición 13 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $A_{19} = 1$ si A es la base en la posición 19 de la cadena codificante, de cualquier otra forma si otra base está presente o la cadena codificante es solamente de 18 pares de base de longitud, su valor es 0;
 $C_3 = 1$ si C es la base en la posición 3 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 15 $C_4 = 1$ si C es la base en la posición 4 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $C_5 = 1$ si C es la base en la posición 5 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $C_6 = 1$ si C es la base en la posición 6 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $C_7 = 1$ si C es la base en la posición 7 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $C_9 = 1$ si C es la base en la posición 9 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 20 $C_{17} = 1$ si C es la base en la posición 17 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $C_{18} = 1$ si C es la base en la posición 18 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $C_{19} = 1$ si C es la base en la posición 19 de la cadena codificante, de cualquier otra forma si otra base está presente o la cadena codificante es solamente de 18 pares de base de longitud, su valor es 0;
 $G_1 = 1$ si G es la base en la posición 1 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 25 $G_2 = 1$ si G es la base en la posición 2 de la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $G_8 = 1$ si G es la base en la posición 8 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $G_{10} = 1$ si G es la base en la posición 10 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $G_{13} = 1$ si G es la base en la posición 13 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $G_{19} = 1$ si G es la base en la posición 19 de la cadena codificante, de cualquier otra forma si otra base está presente o la
 30 cadena codificante es solamente de 18 pares de base de longitud, su valor es 0;
 $U_1 = 1$ si U es la base en la posición 1 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $U_2 = 1$ si U es la base en la posición 2 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $U_3 = 1$ si U es la base en la posición 3 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $U_4 = 1$ si U es la base en la posición 4 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 35 $U_7 = 1$ si U es la base en la posición 7 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $U_9 = 1$ si U es la base en la posición 9 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $U_{10} = 1$ si U es la base en la posición 10 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $U_{15} = 1$ si U es la base en la posición 15 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $U_{16} = 1$ si U es la base en la posición 16 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 40 $U_{17} = 1$ si U es la base en la posición 17 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 $U_{18} = 1$ si U es la base en la posición 18 en la cadena codificante, de cualquier otra forma su valor es 0;
 GC_{15-19} = el número de las bases G y C dentro de las posiciones 15 -19 de la cadena codificante, o dentro de las posiciones 15-18 si la cadena codificante es solamente de 18 pares de base de longitud;
 GC_{total} = el número de las bases G y C en la cadena codificante;
 45 $T_m = 100$ si el oligo del ARNip tiene la repetición interna más larga que 4 pares de bases, de cualquier otra forma su valor es 0, y
 X = el número de veces que se repite el mismo nucleótido cuatro o más veces en una fila.

50 Las Fórmulas VIII y IX anteriores, así como las Fórmulas I - VII, proporcionan métodos para la selección de ARNip con el fin de aumentar la eficiencia del silenciamiento génico. Puede usarse un subconjunto de las variables de cualquiera de las fórmulas, aunque cuando se usan menos variables, la jerarquía de optimización se hace menos fiable.

55 Con respecto a las variables de las fórmulas mencionadas anteriormente, una única letra de A o C o G o U seguida por un subíndice se refiere a una condición binaria. La condición binaria es que o bien la base en particular está presente en esa posición en particular (en donde el valor es "1") o la base no está presente (en donde el valor es "0"). Debido a que la posición 19 es opcional, es *decir* pueden ser sólo 18 pares de bases, cuando sólo hay 18 pares de bases, cualquier base con un subíndice de 19 en las fórmulas anteriores tendría un valor cero para ese parámetro. Antes o después de cada

variable está un número seguido por *, lo que indica que el valor de la variable debe multiplicarse o ponderarse por ese número.

5 Los números que preceden a las variables A, o G, o C, o U en las Fórmulas VIII y IX (o después de las variables en las fórmulas I - VII) se determinaron mediante la comparación de la frecuencia en la frecuencia de las bases individuales en diferentes posiciones en ARNip funcionales y ARNip totales. Específicamente, la frecuencia en la que se observó una base dada en una posición particular en los grupos funcionales se comparó con la frecuencia en que se observó la misma base en el conjunto total de ARNip, seleccionado aleatoriamente. Si se encontró que el valor absoluto de la diferencia entre los valores funcionales y totales es mayor que 6%, se incluye ese parámetro en la ecuación. Así, por ejemplo, si la frecuencia de encontrar una "G" en la posición 13 (G_{13}) se encontró que es 6% en un grupo funcional dado, y la frecuencia de G_{13} en la población total de ARNip es 20%, la diferencia entre los dos valores es de $6\%-20\% = -14\%$. Como el valor absoluto es mayor que seis (6), este factor (-14) se incluye en la ecuación. Así en la Fórmula VIII, en los casos en que el ARNip en estudio tiene una G en la posición 13, el valor acumulado es $(-14)*(1) = -14$. En contraste, cuando una base distinta de G se encuentra en la posición 13, el valor acumulado es $(-14)*(0) = 0$.

15 En el desarrollo de un medio para optimizar ARNip, los inventores observaron que es característico un sesgo hacia una estabilidad termodinámica interna de la doble cadena más baja en el extremo 5' no codificante (AS) de los precursores de miARN de origen natural. Los inventores ampliaron esta observación a ARNip para los que se ha evaluado la funcionalidad en cultivos de tejidos.

20 Con respecto al criterio GC₁₈₋₁₉, puede atribuirse un valor de 0-5 en dependencia del número de bases G o C en las posiciones 15 y 19. Si sólo hay 18 pares de bases, el valor está entre 0 y 4.

25 Con respecto al criterio de contenido total de GC, puede atribuirse un número de 0 a 30, que se correlaciona con el número total de nucleótidos G y C en la cadena codificante, excluyendo los colgantes. Sin desear estar limitados por ninguna teoría, se postula que el significado del contenido de GC (así como también el contenido de AU en las posiciones 15-19, que es un parámetro para las fórmulas III - VII) se refiere a la facilidad de desenrollado de una doble cadena de ARNip bicatenario. Se cree que el desenrollado de la doble cadena es crucial para la funcionalidad del ARNip *in vivo* y una estabilidad interna más baja en general, se cree que especialmente la estabilidad interna más baja del primer par de bases que se desenrolla es importante para mantener una capacidad de procesamiento suficiente del complejo RISC que induce el desenrollado de la doble cadena. Si la doble cadena tiene 19 pares de bases, aquellas en las posiciones 15-19 en la cadena codificante se desenrollarán primero si la molécula exhibe una estabilidad interna suficientemente baja en esa posición. Como los expertos en la materia conocen, RISC es un complejo de aproximadamente doce proteínas; Dicer es una, pero no la única helicasa, dentro de este complejo. En consecuencia, aunque se cree que los parámetros de GC se relacionan a la actividad con Dicer, son importantes además para la actividad con otras proteínas de RISC.

35 El valor del parámetro Tm es 0 cuando no hay repeticiones internas más largas que (o iguales a) cuatro pares de bases presentes en la doble cadena de ARNip, de cualquier otra forma el valor es 1. Así por ejemplo, si la secuencia de ACGUACGU, o cualquier otro palíndromo de cuatro (o más) nucleótidos existe dentro de la estructura, el valor será uno (1). Alternativamente, si existe la estructura ACGGACG, o cualquier otro palíndromo de 3 (o menos) nucleótidos, el valor será cero (0).

40 La variable "X" se refiere al número de veces que el mismo nucleótidos aparece de manera contigua en un tramo de cuatro o más unidades. Si hay, por ejemplo, cuatro A contiguas en una parte de la secuencia y en otra parte de la secuencia cuatro C contiguas, $X=2$. Más aún, si hay dos tramos contiguos separados de cuatro de los mismos nucleótidos u ocho o más de los mismos nucleótidos en una fila, entonces $X=2$. Sin embargo, X no aumenta para cinco, seis o siete nucleótidos contiguos.

45 Una vez más, cuando se aplica la Fórmula VIII o la Fórmula IX a un ARNm dado, (el "ARN diana" o "molécula diana"), puede usarse un programa informático para evaluar los criterios para cada secuencia de 18 - 30 pares de bases o sólo secuencias de una longitud fija, *por ejemplo*, 19 pares de bases. Preferentemente el programa informático está diseñado de tal manera que proporciona un informe de la clasificación de todos los ARNip potenciales entre 18 y 30 pares de bases, clasificados de acuerdo con las secuencias que generan el valor más alto. Un valor más alto se refiere a un ARNip más eficiente para un gen diana particular. El programa informático que puede usarse, puede desarrollarse en cualquier lenguaje de programación que se sabe que es útil para asignar una puntuación a las secuencias de nucleótidos, o puede desarrollarse con la ayuda de productos disponibles comercialmente tal como un producto de la Red de Microsoft. Además, en lugar de correr cada secuencia a través de una y/u otra fórmula, uno puede comparar un subconjunto de secuencias, lo que puede ser deseable si por ejemplo sólo está disponible un subconjunto. Por ejemplo, puede ser deseable realizar primero una búsqueda BLAST

(Basic Local Alignment Search Tool) e identificar secuencias que no tienen homología con otras dianas. Alternativamente, puede ser deseable explorar la secuencia e identificar las regiones de contenido de GC moderado, después realizar los cálculos pertinentes con el uso de una de las fórmulas descritas anteriormente en estas regiones. Estos cálculos pueden realizarse manualmente o con la ayuda de un ordenador.

5

Al igual que con las Fórmulas I - VII, puede usarse la Fórmula VIII o la Fórmula IX para una secuencia dada de ARNm diana. Sin embargo, es posible que de acuerdo con una u otra fórmula más de un ARNip tenga el mismo valor. En consecuencia, es beneficioso tener una segunda fórmula mediante la que diferenciar las secuencias. La Fórmula IX se obtuvo de una manera similar a la Fórmula VIII, sin embargo usa un conjunto de datos más grande y así produce secuencias con correlaciones estadísticas más altas a las dobles cadenas altamente funcionales. La secuencia que tiene el valor más alto asignado puede denominarse como un "primera doble cadena optimizada." La secuencia que tiene el segundo valor más alto asignado puede denominarse como un "segunda doble cadena optimizada." De manera similar, las secuencias que tienen asignados el tercer y cuarto valor más alto pueden denominarse como tercera doble cadena optimizada y cuarta doble cadena optimizada, respectivamente. Cuando más de una secuencia tiene el mismo valor, cada una de ellas puede, por ejemplo, denominarse como primeras secuencias bicatenarias optimizadas o primeras dobles cadenas co-optimizadas.

10

15

Debe señalarse que para las Fórmulas VIII y IX todos los criterios mencionados anteriormente se identifican como posiciones en la cadena codificante cuando se orienta en la dirección 5' a 3' como se identifican en relación con las Fórmulas I - VII a menos que se especifique de cualquier otra forma.

20

Las Fórmulas I - IX, pueden usarse para seleccionar o evaluar uno, o más de un ARNip, con el fin de optimizar el silenciamiento. Preferentemente, al menos dos ARNip optimizados que se han seleccionado de acuerdo con al menos una de estas fórmulas se usan para silenciar un gen, con mayor preferencia al menos tres y con la máxima preferencia al menos cuatro. Los ARNip pueden usarse individualmente o juntos en una mezcla o un kit. Más aún, pueden aplicarse a una célula simultáneamente o por separado. Preferentemente, al menos dos ARNip se aplican simultáneamente. Las mezclas son particularmente beneficiosas para muchas aplicaciones de investigación. Sin embargo, para la terapéutica, puede ser más deseable emplear un único ARNip hiperfuncional como se describe en otra parte en esta solicitud.

25

Cuando se planea llevar a cabo el silenciamiento de genes, y es necesario elegir entre dos o más ARNip, hay que hacerlo mediante la comparación de los valores relativos cuando los ARNip se someten a una de las fórmulas anteriores. Generalmente se debe usar el ARNip de puntuación más alta.

30

Las aplicaciones útiles incluyen, pero sin limitarse a, validación de dianas, análisis funcional de genes, investigación y descubrimiento de fármacos, terapia génica y terapéutica. Los métodos para el uso de ARNip en estas aplicaciones son bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica.

35

Debido a que la capacidad de funcionar del ARNip depende de la secuencia del ARN y no de las especies en las que se introduce, el método es aplicable en una amplia variedad de especies, que incluyen pero sin limitarse a todas las especies de mamíferos, tales como seres humanos, perros, caballos, gatos, vacas, ratones, hámsteres, chimpancés y gorilas, así como también otras especies y organismos tales como bacterias, virus, insectos, plantas y *C. elegans*.

40

El método es aplicable además para usar para el silenciamiento de una amplia variedad de genes, que incluyen, pero sin limitarse a alrededor de los 45,000 genes de un genoma humano, y tiene particular importancia en los casos donde esos genes están asociados con enfermedades tales como la diabetes, la enfermedad de Alzheimer, cáncer, así como también todos los genes en los genomas de los organismos mencionados anteriormente.

45

Las moléculas de ARNip seleccionadas de acuerdo con los criterios mencionados anteriormente o uno de los algoritmos mencionados anteriormente son además, por ejemplo, útiles en el tamizaje simultáneo y el análisis funcional de múltiples genes y familias génicas con el uso de estrategias de gran productividad, así como también en la supresión directa de genes o el silenciamiento.

50

Desarrollo de los algoritmos

Para identificar las características de la secuencia de ARNip que promueven la funcionalidad y para cuantificar la importancia de ciertos factores convencionales actualmente aceptados -tales como contenido de G/C y accesibilidad al sitio diana- los inventores sintetizaron un panel de ARNip que consiste de 270 ARNip dirigidos a tres genes, Ciclofilina Humana, Luciferasa de Luciérnaga y DBI Humana. En los tres casos, los ARNip se orientaron contra regiones específicas de cada gen. Para la Ciclofilina Humana y la Luciferasa de Luciérnaga, se orientaron noventa ARNip contra un segmento de 199 pb

55

cada ARNm correspondiente. Para DBI, se orientaron 90 ARNip contra una región más pequeña del ARNm, de 109 pares de bases. Las secuencias a las que se orientaron los ARNip se proporcionan más abajo.

5 Debe señalarse que en ciertas secuencias, está presente "T". Esto es debido a que muchas bases de datos contienen información de esta manera. Sin embargo, la T denota un residuo uracilo en el ARNm y el ARNip. Cualquier algoritmo procesará, a menos que se especifique de cualquier otra forma, una T en una secuencia como una U.

Ciclofilina Humana: 193-390, M60857

10 Sec. con núm.de ident.: 29

**gttccaaaaacagtggataattttgtggccttagctacaggagagaaaggatttggctacaaaaacagcaaattccatcgtgt
aatcaaggacttcatgatccagggcggagacttcaccaggggagatggcacaggaggaaagagcatctacggtgagcg
ctfccccgatgagaacttcaaactgaagcaclacgggcctggctggg**

Luciferasa de luciérnaga: 1434-1631, U47298 (pGL3, Promega)

15 Sec. con núm. de ident. 30

**tgaactcccgccgccgttgttgtttggagcacggaaagacgatgacggaaaaagagatcgtggattacgtcgccagtca
agtaacaaccgcgaaaaagtgcgcggaggagtgtgtttgtggacgaagtaccgaaaggtcttaccgaaaaactcgacg
caagaaaaatcagagagatcctcataaaggccaagaagg**

DBI, NM_020548 (202-310) (cada posición)

20 Sec. con núm. de ident. 0031:

**acgggcaaggccaagtgggatgcctggaatgagctgaaagggactccaaggaagatgcatgaaagcttacatcaaca
aagtagaagagctaaagaaaaatacggg**

Una lista de los ARNip aparece en la Tabla III (véase la sección Ejemplos, Ejemplo II)

25 El conjunto de dobles cadenas se analizó para identificar correlaciones entre la funcionalidad del ARNip y otras propiedades biofísicas o termodinámicas. Cuando el panel de ARNip se analizó en subgrupos funcionales y no funcionales, ciertos nucleótidos eran mucho más abundantes en ciertas posiciones en los grupos funcionales o no funcionales. Más específicamente, la frecuencia de cada nucleótido en cada posición en dobles cadenas de ARNip altamente funcionales se comparó con la de las dobles cadenas no funcionales con el fin de evaluar la preferencia a por o en contra de cualquier nucleótido dado en cada posición. Estos análisis se usaron para determinar criterios importantes que deben incluirse en los algoritmos de ARNip (Fórmulas VIII y IX).

35 El conjunto de datos se analizó además mediante propiedades biofísicas distintivas de los ARNip en el grupo funcional, tales como por ciento de contenido de GC óptimo, la propensión a las estructuras internas y la estabilidad termodinámica regional. De los criterios que se presentan, algunos están implicados en el reconocimiento de la doble cadena, activación de RISC/desenrollado de la doble cadena, y la catálisis de la escisión de la diana.

40 El conjunto de datos originales que fue la fuente de los criterios obtenidos estadísticamente se muestra en **Figura 2**. Además, esta figura muestra que la selección aleatoria produce dobles cadenas de ARNip con potencias de silenciamiento imprevisibles y ampliamente variables según se mide en el cultivo de tejidos con el uso de células HEK293. En la figura, las dobles cadenas se grafican de tal manera que cada marca de graduación del eje x representa un ARNip individual, con cada ARNip posterior que difiere en dos nucleótidos en la posición de la diana para Ciclofilina Humana y Luciferasa de

Luciérnaga, y en un nucleótido para la DBI humana. Además, el eje y indica el nivel de expresión de la diana que queda después de la transfección de la doble cadena en las células y el posterior silenciamiento de la diana.

El ARNip identificado y optimizado en este documento funciona igualmente bien en una amplia variedad de tipos celulares. La **Figura 3a** muestra la evaluación de treinta ARNip dirigidos al gen de DBI en tres líneas celulares obtenidas a partir de diferentes tejidos. Cada ARNip de DBI muestra una funcionalidad muy similar en células HEK293 (ATCC, CRE-1573, de riñón embrionario humano), HeLa (ATCC, CCL-2, adenocarcinoma epitelial cervical) y DU145 (HTB-81, próstata) determinada mediante el ensayo de B-ADN. Así, la funcionalidad del ARNip está determinada por la secuencia primaria del ARNip y no por el medio ambiente intracelular. Además, debe señalarse que aunque el método proporciona una determinación de la funcionalidad del ARNip para una diana dada, el mismo ARNip puede silenciar más de un gen. Por ejemplo, la secuencia complementaria del ARNip silenciador puede estar presente en más de un gen. En consecuencia, en estas circunstancias, puede ser deseable no usar el ARNip con el SmartScore™ más alto. En tales circunstancias, puede ser deseable usar el ARNip con el siguiente SmartScore™ más alto.

Para determinar la relevancia del contenido de G/C en la función del ARNip, se calculó el contenido de G/C de cada doble cadena en el panel y en consecuencia se ordenaron las clases funcionales de ARNip ($<F50$, $\geq F50$, $\geq F80$, $\geq F95$ donde F se refiere al silenciamiento génico en por ciento). La mayoría de los ARNip altamente funcionales ($\geq F95$) cayó dentro del intervalo de contenido de G/C de 36%-52% (**Figura 3B**). El doble de las dobles cadenas no funcionales ($< F50$) calló en los grupos de alto contenido de G/C ($>57\%$ de contenido de GC) en comparación con el grupo de 36%-52%. El grupo con contenido de GC extremadamente bajo (26% o menos) contenía una proporción más alta de ARNip no funcionales y no de ARNip altamente funcionales. Por lo tanto el intervalo de contenido de G/C del 30%-52% se seleccionó como Criterio I para la funcionalidad del ARNip, consistente con la observación de que un intervalo de G/C de 30%-70% promueve el direccionamiento eficiente de la iARN. La aplicación de este criterio por sí solo proporcionó sólo un aumento marginal en la probabilidad de seleccionar ARNip funcionales del panel: la selección de ARNip F50 y F95 se mejoró en 3.6% y 2.2 %, respectivamente. El panel de ARNip que se presenta aquí permitió un análisis más sistemático y la cuantificación de la importancia de este criterio que el usado previamente.

Una medida relativa de la estabilidad interna local es el contenido de pares de bases A/U (pb), por lo tanto, la frecuencia de A/U pb se determinó para cada una de las cinco posiciones terminales de la doble cadena (5' codificante (S)/5' no codificante (AS)) de todos los ARNip en el panel. Las dobles cadenas se clasificaron después por el número de A/U pb en las posiciones 1-5 y 15-19 de la cadena codificante. La flexibilidad termodinámica del extremo 5' de la doble cadena (posiciones 1-5; S) no parecieron correlacionarse de manera apreciable con la potencia del silenciamiento, mientras que la del extremo 3' (posiciones 15-19; S) se correlacionaron con el silenciamiento eficiente. Las dobles cadenas que carecen de A/U pb en las posiciones 15 a 19 no fueron funcionales. La presencia de un par de bases A/U en esta región confirió cierto grado de funcionalidad, pero la presencia de tres o más A/U fue preferible y por lo tanto, se definió como Criterio II. Cuando se aplicó al panel de prueba, sólo se alcanzó un aumento marginal en la probabilidad de selección de ARNip funcionales: un aumento de 1.8% y de 2.3% para las dobles cadenas F50 y F95, respectivamente (**Tabla IV**).

Las cadenas complementarias de ARNip que contienen repeticiones internas o palíndromos pueden formar estructuras plegadas internas. Estas estructuras similares a horquilla existen en equilibrio con la forma de doble cadena reduciendo de manera efectiva la concentración de dobles cadenas funcionales. La propensión a formar horquillas internas y su estabilidad relativa puede estimarse por las temperaturas de fusión predichas. Una T_m alta refleja una tendencia a formar estructuras de horquilla. Los valores más bajos de T_m indican una menor tendencia a formar horquillas. Cuando las clases funcionales de ARNip se ordenaron por T_m (**Figura 3c**), se identificaron las siguientes tendencias: las dobles cadenas que carecen de repeticiones internas estables fueron los silenciadores más potentes (ninguna doble cadena F95 con estructura de horquilla predicha de $T_m > 60^\circ\text{C}$). En contraste, aproximadamente 60% de las dobles cadenas en los grupos que tienen horquillas internas con valores de T_m calculados menores de 20°C fueron F80. Así, la estabilidad de las repeticiones internas es inversamente proporcional al efecto de silenciamiento y define el Criterio III (estructura de horquilla predicha de $T_m \leq 20^\circ\text{C}$).

Determinantes de la funcionalidad del ARNip basados en la secuencia

Cuando el panel de ARNip se ordenó en grupos funcionales y no funcionales, la frecuencia de un nucleótido específico en cada posición en un ARNip bicatenario funcional se comparó con la de una doble cadena no funcional con el fin de evaluar la preferencia por o en contra de un determinado nucleótido. La **Figura 4** muestra los resultados de estas consultas y el posterior reordenamiento del conjunto de datos (de la Figura 2). Los datos se separan en dos grupos: las dobles cadenas que cumplen los criterios, un nucleótido específico en una determinada posición - agrupados a la izquierda (Seleccionado) y los que no lo hacen - agrupados a la derecha (Eliminado). Las dobles cadenas están ordenadas además desde las más funcionales a las menos funcionales donde el eje Y de las Figuras 4a-e representa la expresión en %, es decir, la cantidad

de silenciamiento que provoca la doble cadena (Nota: cada posición en el eje X representa una doble cadena diferente). El análisis estadístico reveló correlaciones entre el silenciamiento y varias propiedades de los ARNip relacionadas con la secuencia. La **Figura 4** y la **Tabla IV** muestran el análisis cuantitativo de las siguientes cinco propiedades de los ARNip relacionadas con la secuencia: (A) una A en la posición 19 de la cadena codificante; (B) una A en la posición 3 de la cadena codificante; (C) un U en la posición 10 de la cadena codificante; (D) una base distinta de G en la posición 13 de la cadena codificante, y (E) una base distinta de C en la posición 19 de la cadena codificante.

Cuando se evaluaron los ARNip en el panel para la presencia de una A en la posición 19 de la cadena codificante, el porcentaje de dobles cadenas no funcionales disminuyó de 20% a 11.8%, y el porcentaje de dobles cadenas F95 aumentó de 21.7% a 29.4% (**Tabla IV**). Así, la presencia de una A en esta posición define el Criterio IV.

Otra propiedad relacionada con la secuencia que se correlaciona con el silenciamiento es la presencia de una A en la posición 3 de la cadena codificante (**Figura 4b**). De los ARNip con A3, el 34.4% eran F95, en comparación con 21.7% ARNip seleccionados aleatoriamente. La presencia de una base U en la posición 10 de la cadena codificante exhibió un impacto aún mayor (**Figura 4c**). De las dobles cadenas en este grupo, 41.7% eran F95. Estas propiedades se convirtieron en los criterios V y VI, respectivamente.

Dos criterios negativos relacionados con la secuencia que se identificaron además aparecen en la **Figura 4**. La ausencia de una G en la posición 13 de la cadena codificante confirió un aumento marginal en la selección de dobles cadenas funcionales (**Figura 4d**). De manera similar, la carencia de una C en la posición 19 de la cadena codificante se correlacionó además con la funcionalidad (**Figura 4e**). Así, entre las dobles cadenas funcionales, la posición 19 fue ocupada con mayor probabilidad por A, y rara vez ocupada por C. Estas reglas se definieron como los criterios VII y VIII, respectivamente.

La aplicación de cada criterio proporcionó individualmente aumentos marginales pero estadísticamente significativos en la probabilidad de seleccionar un ARNip potente. Aunque los resultados fueron informativos, los inventores intentaron maximizar la potencia y por lo tanto consideraron múltiples criterios o parámetros. La optimización es particularmente importante en el desarrollo de la terapéutica. Curiosamente, la probabilidad de seleccionar un ARNip funcional basado en cada criterio termodinámico fue 2%-4% más alto que la selección aleatoria, pero 4%-8% más alto para los determinados con relación a la secuencia. Presumiblemente, estos aumentos relacionados con la secuencia reflejan la complejidad del mecanismo de iARN y la multitud de interacciones proteína-ARN que están implicados en el silenciamiento mediado por iARN.

Tabla IV

Criterio	% Funcional		Mejora sobre la selección aleatoria
	< F50	≥ F50	
I. Contenido G/C 30%—52%	< F50	16.4%	-3.6%
	≥ F50	83.6%	3.6%
	≥ F80	60.4%	4.3%
	≥ F95	23.9%	2.2%
II. Al menos 3 bases A/U bases en las posiciones 15—19 de la cadena codificante	< F50	18.2%	-1.8%
	≥ F50	81.8%	1.8%
	≥ F80	59.7%	3.6%
	≥ F95	24.0%	2.3%
III. Ausencia de repeticiones internas, medido por T_m de estructura secundaria $\leq 20^\circ\text{C}$	< F50	16.7%	-3.3%
	≥ F50	83.3%	3.3%
	≥ F80	61.1%	5.0%
	≥ F95	24.6%	2.9%
IV. Una base A en la posición 19 de la cadena codificante	< F50	11.8%	-8.2%
	≥ F50	88.2%	8.2%

Criterio	% Funcional		Mejora sobre la selección aleatoria
	≥ F80	75.0%	18.9%
	≥ F95	29.4%	7.7%
V. Una base A en la posición 3 de la cadena codificante	< F50	17.2%	-2.8%
	≥ F50	82.8%	2.8%
	≥ F80	62.5%	6.4%
	≥ F95	34.4%	12.7%
VI. Una base U en la posición 10 de la cadena codificante	< F50	13.9%	-6.1%
	≥ F50	86.1%	6.1%
	≥ F80	69.4%	13.3%
	≥ F95	41.7%	20%
VII. Una base distinta de C en la posición 19 de la cadena codificante.	< F50	18.8%	-1.2%
	≥ F50	81.2%	1.2%
	≥ F80	59.7%	3.6%
	≥ F95	24.2%	2.5%
VIII. Una base distinta de G en la posición 13 de la cadena codificante	< F50	15.2%	-4.8%
	≥ F50	84.8%	4.8%
	≥ F80	61.4%	5.3%
	≥ F95	26.5%	4.8%

Algoritmo de selección de ARNip

5 En un esfuerzo para mejorar más aún la selección, todos los criterios identificados, que incluyen pero sin limitarse a los enumerados en la Tabla IV se combinaron en los algoritmos contenidos en la Fórmula VIII y en la Fórmula IX. Después de cada ARNip se le asignó una puntuación (referida como un SMARTscore™) de acuerdo con los valores derivados de las fórmulas. Las dobles cadenas con una puntuación más alta que 0 o 20, para las Fórmulas VIII y IX, respectivamente, seleccionaron de manera efectiva un conjunto de ARNip funcionales y excluyeron todos los ARNip no funcionales. Por el contrario, todas las dobles cadenas con una puntuación más baja que 0 y 20 de acuerdo con las Fórmulas VIII y IX, respectivamente, contenían algunos ARNip funcionales pero incluían todos los ARNip no funcionales. Una representación gráfica de esta selección se muestra en la **Figura 5**.

15 Los métodos para obtener los siete criterios contenidos en la Tabla IV son ilustrativos de los resultados del proceso usado para desarrollar la información para las Fórmulas VIII y IX. Así se usaron técnicas similares para establecer el resto de las variables y sus multiplicadores. Como se describió anteriormente, se usaron métodos estadísticos básicos para determinar los valores relativos para estos multiplicadores.

20 Para determinar el valor de "Mejora con respecto a la selección Aleatoria" la diferencia en la frecuencia de un atributo dado (por ejemplo, el contenido de GC, la preferencia de bases) en una posición particular se determina entre los grupos funcionales individuales (por ejemplo, <F50) y la población total de ARNip estudiada (por ejemplo 270 moléculas de ARNip seleccionadas aleatoriamente). Así, por ejemplo, en el Criterio I (30%-52% de contenido de GC) se observó que miembros del grupo <F50 tenían contenidos de GC entre 30-52% en 16.4% de los casos. En contraste, el grupo total de 270 ARNip tenía contenidos de GC en este intervalo, 20% de las veces. Así para este atributo en particular, hay una pequeña correlación negativa entre el contenido de GC en 30%-52% y este grupo funcional (es decir 16.4%-20% = -3.6%). De manera similar, para el Criterio VI, (un "U" en la posición 10 de la cadena codificante), el grupo >F95 contenía un "U" en esta posición 41.7% de las veces. En contraste, el grupo total de 270 ARNip tenía un "U" en esta posición 21.7% de las veces, así la mejora con respecto a la selección aleatoria se calcula que sea de 20% (o 41.7%-21.7%).

Identificación del Perfil Promedio de Estabilidad Interna de ARNip Fuertes

Con el fin de identificar un perfil de estabilidad interna característico de los ARNip fuertes, se transfectaron individualmente 270 ARNip diferentes derivados a partir de la ciclofilina B, el inhibidor de la unión del diazepam (DBI), y el gen de la luciferasa en células HEK293 y se probó su capacidad de inducir iARN de los respectivos genes. En base a su rendimiento en el ensayo *in vivo*, las secuencias se subdividieron después en tres grupos, (i) >95% de silenciamiento; (ii) 80-95% de silenciamiento, y (iii) menos de 50% de silenciamiento. Las secuencias que exhibieron un 51-84% de silenciamiento se eliminaron de la consideración adicional para reducir las dificultades en la identificación de patrones termodinámicos relevantes.

Luego de la división de los ARNip en tres grupos, se realizó un análisis estadístico para cada miembro de cada grupo para determinar el perfil promedio de estabilidad interna (AISP) del ARNip. Para lograr esto se utilizó el programa Oligo 5.0 Primer Analysis y otros paquetes estadísticos relacionados (*por ejemplo* Excel) para determinar la estabilidad interna de pentámeros con el uso del método del vecino más cercano descrito por Freier y otros, (1986) Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability, Proc Natl.Acad. Sci. Estados Unidos de América. 83(24): 9373-7. Después los valores para cada grupo en cada posición se promediaron, y los datos resultantes se representaron gráficamente en un sistema de coordenadas lineal donde en el eje Y se expresan los valores de ΔG (energía libre) en kcal/mol y en el eje X se identifica la posición de la base con relación al extremo 5'.

Los resultados del análisis identificaron múltiples regiones clave en las moléculas de ARNip que eran críticas para un silenciamiento génico exitoso. En el extremo más hacia el 3' de la cadena codificante (5' de la no codificante), los ARNip altamente funcionales (>95% de silenciamiento de genes, ver **Figura 6a**, >F95) tienen una baja estabilidad interna (AISP de la posición 19 = ~ -7.6 kcal/mol). En contraste los ARNip de baja eficiencia (*es decir* los que exhiben menos de un 50% de silenciamiento, <F50) muestran un perfil claramente diferente, con altos valores de ΔG (-8.4 kcal/mol) para la misma posición. Al movernos en una dirección 5' (cadena codificante), la estabilidad interna de los ARNip altamente eficientes (posición 12 = ~ -8.3 kcal/mol) aumenta y después cae de nuevo (posición 7 = ~ -7.7 kcal/mol) antes de estabilizarse en un valor de aproximadamente -8.1 kcal/mol para el extremo 5'. Los ARNip con pocas capacidades de silenciamiento muestran un perfil claramente diferente. Si bien el valor del AISP en la posición 12 es casi idéntico al de los ARNip fuertes, los valores en las posiciones 7 y 8 aumentan considerablemente, alcanzando un máximo de ~ -9.0 kcal/mol. Adicionalmente, en el extremo 5' de la molécula el perfil AISP de los ARNip fuertes y débiles difiere dramáticamente. A diferencia de los valores relativamente fuertes exhibidos por los ARNip en el grupo de silenciamiento >95%, los ARNip que exhiben una pobre actividad de silenciamiento tienen valores débiles de AISP (-7.6 , -7.5 , y -7.5 kcal/mol para las posiciones 1, 2 y 3 respectivamente).

En general los perfiles de los ARNip tanto fuertes como débiles forman distintas formas sinusoidales que están desfasados entre sí alrededor de 180° . Si bien estas descripciones termodinámicas definen el perfil arquetípico de un ARNip fuerte, probablemente sea el caso de que ni los valores de ΔG dados para posiciones clave en el perfil o la posición absoluta del perfil a lo largo del eje Y (*es decir*, el eje ΔG) sean absolutos. Los perfiles que se desvían hacia arriba o hacia abajo (*es decir*, que tienen valores promedios, más altos o más bajos en cada posición) pero conservan la forma y la posición relativa del perfil a lo largo del eje X pueden preverse que son igualmente efectivos respecto al perfil modelo descrito aquí. Además, es probable que los ARNip que tienen efectos fuertes o incluso más fuertes de silenciamiento específico de genes puedan tener valores exagerados de ΔG (ya sean más altos o más bajos) en las posiciones clave. Así, por ejemplo, es posible que la posición más hacia el 5' de la cadena codificante (posición 19) pueda tener valores de ΔG de 7.4 kcal/mol o menores y aún ser un ARNip fuerte si, por ejemplo, se sustituye un error de apareamiento G-C \rightarrow G-T/U en la posición 19 y se altera la estabilidad de la doble cadena. De manera similar, la posición 12 y la posición 7 pueden tener valores por encima de 8.3 kcal/mol y por debajo de 7.7 kcal/mol, respectivamente, sin menguar la efectividad de silenciamiento de la molécula. Así, por ejemplo en la posición 12, se podría adicionar una modificación química estabilizante (*por ejemplo* una modificación química en la posición 2' de la cadena principal del azúcar) que aumente la estabilidad interna promedio en esa posición. De manera similar, en la posición 7, podrían introducirse errores de apareamiento similares a los descritos previamente que podrían bajar los valores de ΔG en esa posición.

Por último, es importante señalar que si bien los ARNip funcionales y no funcionales se definieron originalmente como aquellas moléculas que tienen propiedades específicas de silenciamiento, pueden usarse parámetros tanto más amplios como más limitantes para definir estas moléculas. Como se utiliza en la presente, a menos que se especifique de cualquier otra forma, los "ARNip no funcionales" se definen como aquellos ARNip que inducen menos del 50% (<50%) de silenciamiento de la diana, los "ARNip semi-funcionales" inducen un 50-79% de silenciamiento de la diana, los "ARNip funcionales" son moléculas que inducen un 80-95% de silenciamiento génico, y los "ARNip altamente funcionales" son moléculas que inducen más del 95% de silenciamiento génico. Estas definiciones no están destinadas a ser rígidas y

pueden variar en dependencia del diseño y las necesidades de la aplicación. Por ejemplo, es posible que un investigador que intente mapear un gen en un cromosoma con el uso de un ensayo funcional pueda identificar un ARNip que reduce la actividad del gen sólo en un 30%. Si bien este nivel de silenciamiento génico puede ser "no funcional" para *por ejemplo* las necesidades terapéuticas, es suficiente para los propósitos de mapeo de genes y es, en virtud de estos usos y condiciones, "funcional". Por estas razones, los ARNip funcionales pueden definirse como aquellas moléculas que tienen capacidades de silenciamiento de más del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% en condiciones de transfección de 100nM. De manera similar, en dependencia de las necesidades del estudio y/o aplicación, puede definirse que los ARNip no funcionales y semi-funcionales tienen diferentes parámetros. Por ejemplo, puede definirse que los ARNip semi-funcionales son aquellas moléculas que inducen 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, o 70% de silenciamiento en condiciones de transfección de 100nM. De manera similar, puede definirse que los ARNip no funcionales son aquellas moléculas que silencian la expresión génica en menos de 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, o menos. No obstante, a menos que se indique de cualquier otra forma, deben aplicarse las descripciones indicadas en la sección "Definiciones" de este texto.

A cada una de las posiciones clave se le pueden asignar atributos funcionales en los AISP de los ARNip fuertes. Los valores bajos de AISP del 5' (cadena codificante) de los ARNip fuertes pueden ser necesarios para determinar el extremo de la molécula que entra en el complejo RISC. En contraste, los valores de AISP altos y bajos observados en las regiones centrales de la molécula pueden ser críticos para las interacciones ARNip-ARNm diana y para la liberación del producto, respectivamente.

Si los valores de AISP descritos anteriormente definen con precisión los parámetros termodinámicos de los ARNip fuertes, se esperaría observar patrones similares en ARNip fuertes aislados a partir de la naturaleza. Los ARNip naturales existen en un ambiente adverso, rico en ribonucleasas y puede plantearse la hipótesis de que sólo aquellos ARNip que exhiben una afinidad elevada por el RISC (*es decir*, ARNip que exhiben un perfil promedio de estabilidad interna similar a aquellos observados en ARNip fuertes) sobrevivirán en un ambiente intracelular. Esta hipótesis se probó mediante el uso de ARNip específicos para GFP aislados a partir de *N. benthamiana*. Llave y otros (2002) Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. The Plant Cell 14, 1605-1619, introdujeron ARN largo bicatenario que codifica para GFP en plantas y posteriormente volvieron a aislar el ARNip específico para GFP a partir de los tejidos. Se determinaron los AISP de cincuenta y nueve de estos ARNip para GFP, se promediaron, y posteriormente se representaron junto a los perfiles AISP obtenidos de los ARNip para ciclofilina B/DBI/ luciferasa con propiedades de silenciamiento >90% (**Figura 6b**). La comparación de los dos grupos muestra que los perfiles son casi idénticos. Este hallazgo valida la información proporcionada por los perfiles de estabilidad interna y demuestra que: (1) los perfiles identificados mediante el análisis de los ARNip para la ciclofilina B/DBI/ luciferasa no son específicos de los genes, y (2) los valores de AISP pueden usarse para buscar ARNip fuertes en una variedad de especies.

Tanto las modificaciones químicas como los errores de apareamiento de bases pueden incorporarse en los ARNip para alterar el AISP y la funcionalidad de la doble cadena. Por ejemplo, la introducción de errores de apareamiento en las posiciones 1 o 2 de la cadena codificante desestabilizó el extremo 5' de la cadena codificante y aumentó la funcionalidad de la molécula (ver Luc, **Figura 7**). De manera similar, la adición de grupos 2'-O-metilo en las posiciones 1 y 2 de la cadena codificante puede alterar además el AISP y (como resultado) aumentar la funcionalidad de la molécula y eliminar los efectos fuera de diana que resultan a partir de la homología de la cadena codificante con dianas relacionadas (**Figuras 8a, 8b**).

Fundamentación de los Criterios en un Contexto Biológico

El destino de los ARNip en la vía de iARN puede describirse en 5 pasos principales: (1) reconocimiento de la doble cadena y formación de complejos pre-RISC; (2) desenrollado de la doble cadena dependiente de ATP/selección de la cadena y activación del RISC; (3) identificación del ARNm diana; (4) escisión del ARNm, y (5) liberación del producto (Figura 1). Dado el nivel de interacciones ácido nucleico -proteína en cada paso, la funcionalidad de los ARNip probablemente esté influenciada por las propiedades moleculares y biofísicas específicas que promueven interacciones eficientes en el contexto de complejos con múltiples componentes. Claramente, el análisis sistemático del conjunto de pruebas de los ARNip identificó múltiples factores que se correlacionan bien con la funcionalidad. Cuando se combinan en un algoritmo único, probaron ser muy efectivos en la selección de ARNip activos.

Los factores descritos aquí pueden ser también predictivos de asociaciones funcionales claves importantes para cada paso en la iARN. Por ejemplo, la formación potencial de estructuras internas de horquillas se correlacionó negativamente con la funcionalidad de los ARNip. Las cadenas complementarias con repeticiones internas estables son más propensas a existir como horquillas estables lo que disminuye así la concentración efectiva de la forma de doble cadena funcional. Esto sugiere que la doble cadena es la conformación preferida para la asociación inicial del pre-RISC. Claramente, aunque las cadenas

complementarias únicas pueden inducir un silenciamiento génico, la concentración efectiva requerida es más alta en al menos dos órdenes de magnitud que la de la forma bicatenaria.

5 La formación del complejo ARNip-pre-RISC es seguida de una etapa de desenrollado de la doble cadena dependiente de ATP y de "activación" del RISC. Se mostró que la funcionalidad de los ARNip se correlacionó con una baja estabilidad interna en general de la doble cadena y con una baja estabilidad interna del extremo 3' codificante (o estabilidad interna diferencial del 3' codificante en comparación con el 5' de la cadena codificante), que puede reflejar la selección de la cadena y la entrada al RISC. En general la estabilidad de la doble cadena y la baja estabilidad interna en el extremo 3' de la cadena codificante se correlacionaron además con la funcionalidad de los ARNip. De manera interesante, los ARNip con perfiles de estabilidad en general muy altos y muy bajos se correlacionan fuertemente con las dobles cadenas no funcionales. Una interpretación es que la alta estabilidad interna impide un desenrollado eficiente, mientras que una estabilidad muy baja reduce la afinidad del ARNip con la diana y la posterior escisión del ARNm por el RISC.

15 Varios criterios describen preferencias de bases en posiciones específicas de la cadena codificante y son aún más intrigantes cuando se consideran sus posibles funciones mecanicistas en el reconocimiento de la diana y la escisión del ARNm. Las preferencias de bases de A en la posición 19 de la cadena codificante, pero no de C, son particularmente interesantes ya que reflejan las mismas preferencias de bases observadas para los precursores de miARN de origen natural. Es decir, entre las secuencias reportadas de precursores de miARN 75% contiene una U en la posición 1 que se corresponde con una A en la posición 19 de la cadena codificante de los ARNip, mientras que la G estuvo poco representada en esta misma posición en los precursores de miARN. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que tanto los precursores de miARN como las dobles cadenas de ARNip son procesados por una maquinaria proteica muy similar, si no idéntica. La interpretación funcional del predominio del par de bases U/A es que promueve la flexibilidad en los extremos 5' no codificantes tanto de las dobles cadenas de ARNip como de los precursores de miARN y facilita un desenrollado eficiente y una entrada selectiva de la cadena en un RISC activado.

25 Entre los criterios asociados con las preferencias de bases que probablemente influyen en la escisión del ARNm o posiblemente en la liberación del producto, la preferencia por U en la posición 10 de la cadena codificante exhibió el mayor impacto, lo que mejora la probabilidad de seleccionar una secuencia F80 en un 13.3%. El RISC activado escinde preferentemente el ARNm diana entre los nucleótidos 10 y 11 con relación al extremo 5' de la cadena complementaria diana. Por lo tanto, puede ser que el U, la base preferida para la mayoría de endorribonucleasas, en esta posición ayude a una escisión más eficiente. Alternativamente, un par de bases U/A entre la cadena del ARNip dirigido a la diana y sus ARNm diana análogos puede crear una conformación óptima para la actividad de "corte" asociada al RISC.

35 Mezclado

De acuerdo con otra modalidad, la presente invención proporciona una mezcla de al menos dos ARNip, preferentemente en la forma de un kit o reactivo terapéutico, en donde una cadena de cada uno de los ARNip, la cadena codificante comprende una secuencia que es sustancialmente similar a una secuencia de un ARNm diana. La cadena opuesta, la cadena no codificante, preferentemente comprenderá una secuencia que es sustancialmente complementaria a la del ARNm diana. Con mayor preferencia, una cadena de cada ARNip comprenderá una secuencia que es idéntica a una secuencia que está contenida en el ARNm diana. Con la máxima preferencia, cada ARNip será de 19 pares de bases de longitud, y una cadena de cada uno de los ARNip será 100% complementaria a una porción del ARNm diana.

45 Al aumentar el número de ARNip orientados a una diana en particular con el uso de una mezcla o kit, uno es capaz tanto de aumentar la posibilidad de incluir al menos un ARNip con una funcionalidad satisfactoria, así como también beneficiarse de los efectos aditivos o sinérgicos. Más aún, cuando dos o más ARNip orientados contra un único gen no tienen niveles satisfactorios de funcionalidad por sí solos, si se combinan, pueden promover satisfactoriamente la degradación del ARN mensajero diana e inhibir exitosamente la traducción. Mediante la inclusión de múltiples ARNip en el sistema, no sólo aumenta la probabilidad de silenciamiento, sino que además mejora la economía de la operación en comparación con la adición de diferentes ARNip de manera secuencial. Este efecto es contrario a la creencia convencional de que el uso simultáneo de múltiples ARNip tendrá un impacto negativo en el silenciamiento génico (*por ejemplo*, Hoken, T. y otros (2003) "Similar behavior of single strand and double strand siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway." NAR 31: 2401-21407).

55 De hecho, cuando se mezclaron dos ARNip, el 54% de las mezclas de los dos ARNip indujo más del 95% de silenciamiento génico. Así, se alcanzó un aumento de 2.5 veces en el porcentaje de funcionalidad mediante la combinación aleatoria de dos ARNip. Más aún, más del 84% de las mezclas que contenían dos ARNip indujeron más de un 80% de silenciamiento génico.

Con mayor preferencia, el kit comprende al menos tres ARNip, en donde una cadena de cada ARNip comprende una secuencia que es sustancialmente similar a una secuencia del ARNm diana y la otra cadena comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria a la región del ARNm diana. Al igual que con el kit que comprende al menos dos ARNip, con mayor preferencia una cadena comprenderá una secuencia que es idéntica a una secuencia que está contenida en el ARNm y la otra cadena que es 100% complementaria a una secuencia que está contenida en el ARNm. Durante los experimentos, cuando se combinaron tres ARNip, 60% de las mezclas indujo más de 95% de silenciamiento génico y 92% de las mezclas indujo más de 80% de silenciamiento génico.

Además, aún con mayor preferencia, el kit comprende al menos cuatro ARNip, en donde una cadena de cada ARNip comprende una secuencia que es sustancialmente similar a una región de la secuencia del ARNm diana, y la otra cadena comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria a la región del ARNm diana. Al igual que con el kit o mezcla que comprende al menos dos ARNip, con mayor preferencia una cadena de cada una de las dobles cadenas de ARNip comprenderá una secuencia que es idéntica a una secuencia que está contenida en el ARNm, y la otra cadena que es 100% complementaria a una secuencia que está contenida en el ARNm.

Además, los kits y mezclas con al menos cinco, al menos seis, y al menos siete ARNip pueden además ser útiles con la presente invención. Por ejemplo, las mezclas de cinco ARNip inducen 95% de silenciamiento génico con 77% de probabilidad y 80% de silenciamiento con 98.8% de probabilidad. Así, la mezcla de los ARNip puede resultar en la creación de un reactivo de silenciamiento específico para dianas con casi 99% de probabilidad de ser funcional. El hecho de que se alcancen tales niveles altos de éxito con el uso de tales mezclas de ARNip, permite prescindir de procedimientos de validación específicos para dianas que son costosos y requieren mucho tiempo.

Para esta modalidad, así como también las otras modalidades mencionadas anteriormente, cada uno de los ARNip dentro de una mezcla comprenderá preferentemente entre 18 y 30 pares de bases, con mayor preferencia entre 18 y 25 pares de bases, y con la máxima preferencia 19 pares de bases. Dentro de cada ARNip, preferentemente al menos 18 bases contiguas de la cadena no codificante serán 100% complementarias al ARNm diana. Con mayor preferencia, al menos 19 bases contiguas de la cadena no codificante serán 100% complementarias al ARNm diana. Además, pueden haber bases colgantes ya sea en la cadena codificante como en la cadena no codificante, y estas bases colgantes pueden estar en el extremo 5' o en el extremo 3' de cualquiera de las cadenas, por ejemplo puede haber uno o más colgantes de 1-6 bases. Cuando están presentes las bases colgantes, no se incluyen en el cálculo del número de pares de bases. Los dos colgantes nucleotídicos en 3' imitan los ARNip naturales y se usan comúnmente pero no son esenciales. Preferentemente, los colgantes deben consistir de dos nucleótidos, más frecuentemente dTdT o UU en el extremo 3' de la cadena codificante y no codificante que no son complementarios con la secuencia diana. Los ARNip pueden producirse mediante cualquier método que se conoce ahora o que llegue a conocerse para la síntesis de ARN bicatenario que un aquellos con experiencia en la técnica apreciarían como útil en la presente invención. Preferentemente, los ARNip se producirán mediante la tecnología ACE® propiedad de Dharmacon. Sin embargo, otros métodos para la síntesis de ARNip son bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a, cualquier síntesis química de oligonucleótidos de ARN, ligación de oligonucleótidos más cortos, transcripción *in vitro* de oligonucleótidos de ARN, el uso de vectores para la expresión dentro de células, productos de Dicer recombinante y productos de PCR.

Las dobles cadenas de ARNip dentro de las mezclas de ARNip mencionadas anteriormente pueden corresponder a secuencias superpuestas dentro de un ARNm particular, o secuencias no superpuestas del ARNm. Sin embargo, preferentemente se corresponden con secuencias no superpuestas. Más aún, cada ARNip puede seleccionarse aleatoriamente, o uno o más de los ARNip puede seleccionarse de acuerdo con los criterios discutidos anteriormente para maximizar la efectividad del ARNip.

Los ARNip que contienen nucleótidos sustituidos y/o marcados que pueden, por ejemplo, marcarse por radiactividad, fluorescencia o masa están incluidos en la definición de ARNip. Las sustituciones más comunes están en la posición 2' del azúcar ribosa, donde pueden sustituirse las porciones tales como H (hidrógeno) F, NH₃, OCH₃ y otros O-alquilo, alqueno, alquino, y ortoésteres, o en la cadena principal de fósforo, donde el azufre, aminos o hidrocarburos pueden sustituirse para la unión de átomos no unidos en el enlace fosfodiéster. Los ejemplos de ARNip modificados se explican más completamente en la solicitud de patente de Estados Unidos cedida en forma mancomunada con núm. de serie 10/613,077, presentada el 1 de julio de 2003, y publicada como US 2004/0266707.

Además, como se señaló anteriormente, el tipo celular en el que se introducen los ARNip puede afectar la capacidad del ARNip para entrar en la célula; sin embargo, no parece afectar la capacidad del ARNip de funcionar una vez que entra en la célula. Los métodos para la introducción de ARN bicatenario en diversos tipos de células son bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica.

Como es conocido por aquellos con experiencia en la técnica, en ciertas especies, la presencia de proteínas tales como RdRP, la ARN polimerasa dependiente de ARN, puede mejorar catalíticamente la actividad de los ARNip. Por ejemplo, RdRP propaga el efecto de iARN en *C. elegans* y otros organismos no mamíferos. De hecho, en los organismos que contienen estas proteínas, el ARNip puede heredarse. Otras dos proteínas que están bien estudiadas y que se conocen por ser una parte de la maquinaria son miembros de la familia Argonaute y Dicer, así como también sus homólogos. Además hay evidencia inicial de que el complejo RISC podría asociarse con el ribosoma de manera que los ARNm traducidos más eficientemente sean más susceptibles al silenciamiento que otros.

Otro factor muy importante en la eficacia de los ARNip es la localización del ARNm. En general, se considera que sólo los ARNm citoplasmáticos son accesibles al iARN en un grado apreciable. Sin embargo, los ARNip diseñados apropiadamente, por ejemplo, ARNip modificados con enlaces internucleotídicos, pueden ser capaces de causar silenciamiento al actuar en el núcleo. Los ejemplos de estos tipos de modificaciones se describen en las solicitudes de patente de Estados Unidos cedidas en forma mancomunada con núms. de serie 10/431,027 (publicada como US 2004/0224405) y 10/613,077 (publicada como US 2004/0266707).

Como se describió anteriormente, incluso cuando uno selecciona al menos dos ARNip de manera aleatoria, la efectividad de los dos puede ser mayor que la que uno podría predecir sobre la base de la efectividad de los dos ARNip individuales. Este efecto aditivo o sinérgico es particularmente notable a medida que uno aumenta al menos a tres ARNip, y aún más notable a medida que uno se mueve al menos a cuatro ARNip. Sorprendentemente, la mezcla de los ARNip no funcionales y semi-funcionales, particularmente más de cinco ARNip, puede conducir a una preparación de silenciamiento que es tan efectiva, si no más efectiva, que cualquier ARNip funcional particular.

Dentro del kit de la presente invención, preferentemente cada ARNip estará presente en una concentración de entre 0.001 y 200 μ M, con mayor preferencia entre 0.01 y 200 nM, y con la máxima preferencia entre 0.1 y 10 nM.

Además de comprender preferentemente al menos cuatro o cinco ARNip, el kit de la presente invención comprenderá además preferentemente un tampón para mantener estable la doble cadena de ARNip. Aquellos con experiencia en la técnica conocen los amortiguadores adecuados para mantener estable los ARNip. Por ejemplo, el tampón puede comprender KCl 100 mM, HEPES 30 mM pH 7.5, y $MgCl_2$ 1 mM. Alternativamente, los kits pueden contener cadenas complementarias que contienen cualquiera de un número de modificaciones químicas (*por ejemplo*, un 2'-O-ACE) que protege a los agentes de la degradación por nucleasas. En este ejemplo, el usuario puede (o no) eliminar el grupo protector modificador (*por ejemplo* desproteger) antes de la hibridación de las dos cadenas complementarias juntas.

A modo de ejemplo, el kit puede organizarse de tal manera que se proporcionen las mezclas de dobles cadenas de ARNip en un arreglo o microarreglo de pocillos o gotas para un conjunto de genes en particular o para genes no relacionados. El arreglo puede ser, por ejemplo, en 96 pocillos, 384 pocillos o 1284 pocillos dispuestos en una placa plástica o en un portaobjetos de vidrio con el uso de técnicas que se conocen ahora o que lleguen a conocerse por aquellos con experiencia en la técnica. Dentro de un arreglo, preferentemente habrán controles tales como anti-lamina A/C funcional, ciclofilina y dos dobles cadenas de ARNip que no son específicos para el gen de interés.

Con el fin de garantizar la estabilidad de las mezclas de ARNip antes de su uso, estos pueden conservarse en forma liofilizada a menos veinte grados (-20°C) hasta que estén listos para su uso. Antes de usarse, deben resuspenderse; sin embargo, incluso una vez resuspendidos, por ejemplo, en el tampón mencionado anteriormente, deben mantenerse a menos veinte grados, (-20°C) hasta que se usen. El tampón mencionado anteriormente, antes de su uso, puede almacenarse a aproximadamente 4°C o a temperatura ambiente. Aquellos con experiencia en la técnica conocen bien las temperaturas efectivas para llevar a cabo transfecciones e incluyen, por ejemplo, temperaturas ambientales.

El kit puede aplicarse ya sea *in vivo* o *in vitro*. Preferentemente, los ARNip de las mezclas o kits se aplican a una célula a través de transfección, mediante el empleo de protocolos de transfección estándar. Estos métodos son bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica e incluyen el uso de vehículos basados en lípidos, electroporación, vehículos catiónicos, y microinyección. Más aún, uno podría aplicar la presente invención mediante la síntesis de secuencias equivalentes de ADN (ya sea como dos cadenas separadas, complementarias, o como moléculas con horquillas) en lugar de secuencias de ARNip y su introducción en células a través de vectores. Una vez en las células, el ADN clonado podría transcribirse, forzando de ese modo a las células a generar el ARNip. Los ejemplos de vectores adecuados para su uso con la presente solicitud incluyen pero sin limitarse a los vectores estándar de expresión transitoria, adenovirus, retrovirus, vectores basados en lentivirus, así como también otros vectores de expresión tradicionales. Puede usarse cualquier vector que tenga un módulo de expresión y procesamiento de ARNip adecuado. Además de esto, ciertas modificaciones químicas a los ARNip, que incluyen pero sin limitarse a conjugaciones a otras moléculas, pueden usarse para facilitar la entrega. Para

ciertas aplicaciones puede ser preferible entregar moléculas sin transfección simplemente al formularse en una solución fisiológicamente aceptable.

5 Esta modalidad puede usarse en conexión con cualquiera de las modalidades mencionadas anteriormente. En consecuencia, las secuencias dentro de cualquier mezcla pueden seleccionarse mediante un diseño racional.

Silenciamiento de Múltiples Genes

10 Además de desarrollar kits que contienen múltiples ARNip orientados contra un único gen, es posible usar múltiples ARNip dirigidos a múltiples genes (siempre y cuando al menos un ARNip sea una molécula de ARNip de la presente invención). Pueden seleccionarse múltiples genes a través del uso de ARNip altamente funcionales o hiperfuncionales. Los ARNip altamente funcionales o hiperfuncionales que exhiben mayor potencia, requieren concentraciones más bajas para inducir los efectos fenotípicos deseados (y por lo tanto terapéuticos). Esto evita la saturación del RISC. Por lo tanto se concluye que si se necesitan concentraciones más bajas de un ARNip único para anular o reducir la expresión de un gen, entonces los RISC restantes (no acoplejados) estarán libres y disponibles para interactuar con ARNip orientados contra dos, tres, cuatro, o más, genes. Así los autores describen el uso de ARNip altamente funcionales o hiperfuncionales para anular a tres genes separados. Con mayor preferencia, dichos reactivos pueden combinarse para anular cuatro genes distintos. Aún con mayor preferencia, los ARNip altamente funcionales o hiperfuncionales podrían usarse para anular cinco genes diferentes. Con la máxima preferencia, los ARNip de este tipo podrían usarse para anular o reducir la expresión de seis genes o más.

ARNip hiperfuncionales

25 El término ARNip hiperfuncional (hf-ARNip) describe un subconjunto de la población de ARNip que induce iARN en las células a concentraciones bajas o subnanomolares durante períodos de tiempo prolongados. Estas características, potencia elevada y longevidad prolongada del fenotipo de iARN, son muy atractivas desde un punto de vista terapéutico. Los agentes que tienen mayor potencia requieren menores cantidades de la molécula para alcanzar la respuesta fisiológica deseada, lo que reduce así la probabilidad de efectos secundarios debido a una interferencia "fuera de la diana". Además de los beneficios terapéuticos potenciales asociados con los ARNip hiperfuncionales, los hf-ARNip son además deseables desde una posición económica. Los ARNip hiperfuncionales pueden costar menos en base al tratamiento, lo que reduce así los gastos generales tanto para el fabricante como para el consumidor.

35 La identificación de ARNip hiperfuncionales implica múltiples etapas que están diseñadas para examinar una concentración de un agente ARNip individual y/o los perfiles de longevidad. En un ejemplo no limitante, una población de ARNip orientados contra un único gen se analiza primero con el uso del algoritmo descrito previamente (Fórmula VIII). Después los ARNip individuales se introducen en una línea celular de prueba y se evalúa su capacidad de degradar el ARNm diana. Es importante señalar que al realizar esta etapa no es necesario poner a prueba la totalidad de los ARNip. En cambio es suficiente probar sólo aquellos ARNip que tienen los más altos SMARTscores™ (es decir, SMARTscore™ > -10). Posteriormente, los datos del silenciamiento génico se representan frente a los SMARTscores™ (ver **Figura 9**). Los ARNip que (1) inducen un grado alto de silenciamiento génico (es decir inducen una reducción mayor que 80% del gen) y (2) tienen SMARTscores™ superiores (es decir, un SMARTscore™ > -10, lo que sugiere un perfil promedio de estabilidad interna deseable) se seleccionan para investigaciones adicionales destinadas a comprender mejor la potencia y la longevidad de la molécula. En un estudio no limitante dedicado a comprender la potencia de una molécula, se introduce un ARNip en un (o más) tipos celulares en concentraciones gradualmente decrecientes (*por ejemplo*, 3.0 → 0.3 nM). Posteriormente, se examina el nivel de silenciamiento génico inducido por cada concentración y se identifican los ARNip que exhiben una potencia hiperfuncional (es decir aquellos que inducen 80% de silenciamiento o mayor a *por ejemplo* concentraciones picomolares). En un segundo estudio, se examinan los perfiles de longevidad de los ARNip que tienen SMARTscores™ altos (>-10) y un silenciamiento mayor que 80%. En un ejemplo no limitante de cómo se alcanza esto, los ARNip se introducen en una línea celular de prueba y se miden los niveles de iARN durante un período de tiempo prolongado (*por ejemplo* 24-168 horas). Así se identifican ARNip que exhiben patrones fuertes de interferencia de ARN (es decir interferencia > 80%) durante períodos de tiempo mayores que, *por ejemplo*, 120 horas. Estudios similares a los descritos anteriormente pueden realizarse para cualquiera y para todos los >10⁶ ARNip incluidos en este documento para definir más aún la molécula más funcional para cualquier gen dado. Las moléculas que poseen una o ambas propiedades (longevidad prolongada y potencia elevada) se denominan "ARNip hiperfuncionales", y se destinan como candidatos para futuros estudios terapéuticos.

55 Si bien el(los) ejemplo(s) dado(s) anteriormente describe(n) un medio por el que pueden aislarse ARNip hiperfuncionales, ni los propios ensayos ni los parámetros de selección usados son rígidos y pueden variar con cada familia de ARNip. Las familias de ARNip incluyen ARNip orientados contra un único gen, u orientados contra una familia relacionada de genes.

La más alta calidad de ARNip alcanzable para cualquier gen dado puede variar considerablemente. Así, por ejemplo, en el caso de un gen (gen X), estudios rigurosos tales como los descritos anteriormente pueden permitir la identificación de un ARNip que, en concentraciones picomolares, induce 99% de silenciamiento por un período de 10 días. Sin embargo estudios idénticos de un segundo gen (gen Y) pueden producir un ARNip que a concentraciones nanomolares altas (por ejemplo 100 nM) induce sólo 75% de silenciamiento durante un período de 2 días. Ambas moléculas representan el ARNip más óptimo para sus respectivos genes diana y por lo tanto se designan como "hiperfuncionales". Sin embargo debido a una variedad de factores que incluyen pero sin limitarse a la concentración de la diana, la estabilidad del ARNip, el tipo celular, la interferencia fuera de la diana, y otros, los niveles equivalentes de potencia y longevidad no son alcanzables. Así, por estas razones, los parámetros descritos en los ensayos antes mencionados, pueden variar. Si bien el tamizaje inicial seleccionó ARNip que tenían SMARTscores™ por encima de -10 y una capacidad de silenciamiento génico mayor que un 80%, pueden implementarse selecciones que tienen parámetros más fuertes (o más débiles). De manera similar, en los estudios posteriores diseñados para identificar moléculas con potencia y longevidad altas, los criterios de corte deseados (es decir la concentración más baja que induce un nivel de interferencia deseable, o el período de tiempo más largo en que pueda observarse la interferencia) pueden variar. La experimentación posterior a la aplicación de los criterios racionales de esta aplicación se reduce significativamente cuando uno trata de obtener un ARNip hiperfuncional adecuado para, por ejemplo, un uso terapéutico. Cuando, por ejemplo, la experimentación adicional del tipo descrito en la presente invención se aplica por un experto en la materia con esta descripción en la mano, un ARNip hiperfuncional se identifica fácilmente.

El ARNip puede introducirse en una célula mediante cualquier método que se conoce ahora o que llegue a conocerse y que a partir de la lectura de esta descripción, aquellos con experiencia en la técnica puedan determinar si sería útil en relación con la presente invención en permitir que el ARNip atraviese la membrana celular. Estos métodos incluyen, pero sin limitarse a, cualquier manera de transfección, tales como por ejemplo la transfección mediante el empleo de DEAE-dextrano, fosfato cálcico, lípidos catiónicos/liposomas, micelas, manipulación de la presión, microinyección, electroporación, inmunoporación, uso de vectores tales como virus, plásmidos, cósmidos, bacteriófagos, fusiones celulares, y acoplamiento de los polinucleótidos a conjugados o ligandos específicos tales como anticuerpos, antígenos, o receptores, introducción pasiva, por la adición de porciones al ARNip que facilitan su captación, y similares.

Luego de describir la invención con un grado de particularidad, ahora se proporcionarán ejemplos. Estos ejemplos no pretenden y no debe interpretarse que limitan el alcance de las reivindicaciones en modo alguno.

Ejemplos de Referencia

Técnicas Generales y Nomenclatura

Nomenclatura de los ARNip. A todas las dobles cadenas de ARNip son referidas por cadena codificante. El primer nucleótido del extremo 5' de la cadena codificante es la posición 1, que se corresponde con la posición 19 de la cadena no codificante de 19-mer. En la mayoría de los casos, para comparar los resultados de diferentes experimentos, el silenciamiento se determinó mediante la medición de los niveles de transcritos de ARNm específicos o la actividad enzimática asociada con los niveles de transcritos específicos, 24 horas después de la transfección, con concentraciones de ARNip mantenidas constantes a 100 nM. Para todos los experimentos, a menos que se especifique de cualquier otra forma la eficiencia de la transfección se aseguró en más de 95%, y no se observó toxicidad celular detectable. El siguiente sistema de nomenclatura se utilizó para comparar e informar la funcionalidad del silenciamiento por ARNip: "F" seguida del grado de reducción mínima. Por ejemplo, F50 significa al menos un 50% de reducción, F80 significa al menos 80%, etcétera. Para este estudio, todos los ARNip por debajo de F50 se consideraron no funcionales.

Cultivo celular y transfección. Las placas de 96 pocillos se recubren con 50 µl de 50 mg/ml de poli-L-lisina (Sigma) durante 1 h, y después se lavan 3 veces con agua destilada antes de secarse por 20 min. Las células HEK293 o HEK293Lucs o cualquier otro tipo de célula de interés se liberan de su soporte sólido mediante tripsinización, se diluyen a 3.5×10^5 células/ml, seguido por la adición de 100 µl de células/pocillo. Después las placas se incuban durante la noche a 37°C, en 5% de CO₂. Los procedimientos de transfección pueden variar ampliamente en dependencia del tipo de células y los reactivos de transfección. En un ejemplo no limitante, se hace una preparación de transfección que consiste en 2 ml de Opti-MEM I (Gibco-BRL), 80 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen), 15 µl de SUPERNasin a 20 U/µl (Ambion), y 1.5 µl del plásmido con el gen reportero a 1 µg/µl en tubos de poliestireno de fondo redondo de 5 ml. Después se combinan 100 µl del reactivo de transfección con 100 µl de ARNip en placas de titulación de pocillo profundo de poliestireno (Beckman) y se incuban durante 20 a 30 min a temperatura ambiente. Después se añaden 550 µl de Opti-MEM a cada pocillo para llevar la concentración final de ARNip a 100 nM. Las placas se sellan después con parafilm y se mezclan. Los medios se eliminan de las células HEK293 y se reemplazan con 95 µl de la preparación de transfección. Las células se incuban durante la noche a 37°C, en 5% de CO₂.

Cuantificación de la reducción génica. Una variedad de procedimientos de cuantificación puede usarse para medir el nivel de silenciamiento inducido por el ARNip o por las mezclas de ARNip. En un ejemplo no limitante: para medir los niveles de ARNm 24 horas después de la transfección, se usan los kits QuantiGene branched-DNA (bDNA) (Bayer) (Wang, y otros, Regulation of insulin preRNA splicing by glucose. Proc Natl Acad Sci 1997, 94:4360) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para medir la actividad de la luciferasa, los medios se eliminan de las células HEK293 24 horas después de la transfección, y se añaden 50 µl del reactivo Steady-GLO (Promega). Después de 5 min, las placas se analizan en un lector de placas.

Ejemplo I. Secuencias Usadas para Desarrollar el Algoritmo.

Los paneles de ARNip anti-luciferasa de luciérnaga y anti-ciclofilina (**Figura 5a, b**) se ordenaron según los valores predichos con la Fórmula VIII. Todos los ARNip con una puntuación mayor que 0 (fórmula VIII) y mayor que 20 (fórmula IX) son totalmente funcionales. Las noventa secuencias para cada gen (y DBI) aparecen más abajo en la **Tabla III**.

TABLA III

Ciclo	1	Sec. con núm. de ident. 0032	GUUCCAAAAACAGUGGAUA
Ciclo	2	Sec. con núm. de ident. 0033	UCCAAAAACAGUGGAUAAU
Ciclo	3	Sec. con núm. de ident. 0034	CAAAAACAGUGGAUAAUUU
Ciclo	4	Sec. con núm. de ident. 0035	AAACAGUGGAUAAUUUUG
Ciclo	5	Sec. con núm. de ident. 0036	AACAGUGGAUAAUUUUGUG
Ciclo	6	Sec. con núm. de ident. 0037	CAGUGGAUAAUUUUGUGGC
Ciclo	7	Sec. con núm. de ident. 0038	GUGGAUAAUUUUGUGGCCU
Ciclo	8	Sec. con núm. de ident. 0039	GGAUAAUUUUGUGGCCUUA
Ciclo	9	Sec. con núm. de ident. 0040	AUAAUUUUGUGGCCUUAGC
Ciclo	10	Sec. con núm. de ident. 0041	AAUUUUGUGGCCUUAGCUA
Ciclo	11	Sec. con núm. de ident. 0042	UUUUGUGGCCUUAGCUACA
Ciclo	12	Sec. con núm. de ident. 0043	UUGUGGCCUUAGCUACAGG
Ciclo	13	Sec. con núm. de ident. 0044	GUGGCCUUAGCUACAGGAG
Ciclo	14	Sec. con núm. de ident. 0045	GGCCUUAGCUACAGGAGAG
Ciclo	15	Sec. con núm. de ident. 0046	CCUUAGCUACAGGAGAGAA
Ciclo	16	Sec. con núm. de ident. 0047	UUAGCUACAGGAGAGAAAG
Ciclo	17	Sec. con núm. de ident. 0048	AGCUACAGGAGAGAAAGGA
Ciclo	18	Sec. con núm. de ident. 0049	CUACAGGAGAGAAAGGAUU
Ciclo	19	Sec. con núm. de ident. 0050	ACAGGAGAGAAAGGAUUUG
Ciclo	20	Sec. con núm. de ident. 0051	AGGAGAGAAAGGAUUUGGC
Ciclo	21	Sec. con núm. de ident. 0052	GAGAGAAAGGAUUUGGCUA
Ciclo	22	Sec. con núm. de ident. 0053	GAGAAAGGAUUUGGCUACA
Ciclo	23	Sec. con núm. de ident. 0054	GAAAGGAUUUGGCUACAAA
Ciclo	24	Sec. con núm. de ident. 0055	AAGGAUUUGGCUACAAAAA
Ciclo	25	Sec. con núm. de ident. 0056	GGAUUUGGCUACAAAAACA
Ciclo	26	Sec. con núm. de ident. 0057	AUUUGGCUACAAAAACAGC
Ciclo	27	Sec. con núm. de ident. 0058	UUGGCUACAAAAACAGCAA

ES 2 440 284 T3

Ciclo	28	Sec. con núm. de ident. 0059	GGCUACAAAAACAGCAAAU
Ciclo	29	Sec. con núm. de ident. 0060	CUACAAAAACAGCAAAUUC
Ciclo	30	Sec. con núm. de ident. 0061	ACAAAAACAGCAAAUCCA
Ciclo	31	Sec. con núm. de ident. 0062	AAAAACAGCAAAUCCAUC
Ciclo	32	Sec. con núm. de ident. 0063	AAACAGCAAAUCCAUCGU
Ciclo	33	Sec. con núm. de ident. 0064	ACAGCAAAUCCAUCGUGU
Ciclo	34	Sec. con núm. de ident. 0065	AGCAAAUCCAUCGUGUAA
Ciclo	35	Sec. con núm. de ident. 0066	CAAAUCCAUCGUGUAAUC
Ciclo	36	Sec. con núm. de ident. 0067	AAUCCAUCGUGUAAUCA
Ciclo	37	Sec. con núm. de ident. 0068	UCCAUCGUGUAAUCAAGG
Ciclo	38	Sec. con núm. de ident. 0069	CCAUCGUGUAAUCAAGGAC
Ciclo	39	Sec. con núm. de ident. 0070	AUCGUGUAAUCAAGGACUU
Ciclo	40	Sec. con núm. de ident. 0071	CGUGUAAUCAAGGACUUCA
Ciclo	41	Sec. con núm. de ident. 0072	UGUAAUCAAGGACUUCAUG
Ciclo	42	Sec. con núm. de ident. 0073	UAAUCAAGGACUUCAUGAU
Ciclo	43	Sec. con núm. de ident. 0074	AUCAAGGACUUCAUGAUCC
Ciclo	44	Sec. con núm. de ident. 0075	CAAGGACUUCAUGAUCCAG
Ciclo	45	Sec. con núm. de ident. 0076	AGGACUUCAUGAUCCAGGG
Ciclo	46	Sec. con núm. de ident. 0077	GACUUCAUGAUCCAGGGCG
Ciclo	47	Sec. con núm. de ident. 0078	CUUCAUGAUCCAGGGCGGA
Ciclo	48	Sec. con núm. de ident. 0079	UCAUGAUCCAGGGCGGAGA
Ciclo	49	Sec. con núm. de ident. 0080	AUGAUCCAGGGCGGAGACU
Ciclo	50	Sec. con núm. de ident. 0081	GAUCCAGGGCGGAGACUUC
Ciclo	51	Sec. con núm. de ident. 0082	UCCAGGGCGGAGACUUCAC
Ciclo	52	Sec. con núm. de ident. 0083	CAGGGCGGAGACUUCACCA
Ciclo	53	Sec. con núm. de ident. 0084	GGGCGGAGACUUCACCAGG
Ciclo	54	Sec. con núm. de ident. 0085	GCGGAGACUUCACCAGGGG
Ciclo	55	Sec. con núm. de ident. 0086	GGAGACUUCACCAGGGGAG
Ciclo	56	Sec. con núm. de ident. 0087	AGACUUCACCAGGGGAGAU
Ciclo	57	Sec. con núm. de ident. 0088	ACUUCACCAGGGGAGAUGG
Ciclo	58	Sec. con núm. de ident. 0089	UUCACCAGGGGAGAUGGCA
Ciclo	59	Sec. con núm. de ident. 0090	CACCAGGGGAGAUGGCACA
Ciclo	60	Sec. con núm. de ident. 0091	CCAGGGGAGAUGGCACAGG
Ciclo	61	Sec. con núm. de ident. 0092	AGGGGAGAUGGCACAGGAG
Ciclo	62	Sec. con núm. de ident. 0093	GGGAGAUGGCACAGGAGGA
Ciclo	63	Sec. con núm. de ident. 0094	GAGAUGGCACAGGAGGAAA

ES 2 440 284 T3

Ciclo	64	Sec. con núm. de ident. 0095	GAUGGCACAGGAGGAAAGA
Ciclo	65	Sec. con núm. de ident. 0094	UGGCACAGGAGGAAAGAGC
Ciclo	66	Sec. con núm. de ident. 0096	GCACAGGAGGAAAGAGCAU
Ciclo	67	Sec. con núm. de ident. 0097	ACAGGAGGAAAGAGCAUCU
Ciclo	68	Sec. con núm. de ident. 0098	AGGAGGAAAGAGCAUCUAC
Ciclo	69	Sec. con núm. de ident. 0099	GAGGAAAGAGCAUCUACGG
Ciclo	70	Sec. con núm. de ident. 0100	GGAAAGAGCAUCUACGGUG
Ciclo	71	Sec. con núm. de ident. 0101	AAAGAGCAUCUACGGUGAG
Ciclo	72	Sec. con núm. de ident. 0102	AGAGCAUCUACGGUGAGCG
Ciclo	73	Sec. con núm. de ident. 0103	AGCAUCUACGGUGAGCGCU
Ciclo	74	Sec. con núm. de ident. 0104	CAUCUACGGUGAGCGCUUC
Ciclo	75	Sec. con núm. de ident. 0105	UCUACGGUGAGCGCUUCCC
Ciclo	76	Sec. con núm. de ident. 0106	UACGGUGAGCGCUUCCCCG
Ciclo	77	Sec. con núm. de ident. 0107	CGGUGAGCGCUUCCCCGAU
Ciclo	78	Sec. con núm. de ident. 0108	GUGAGCGCUUCCCCGAUGA
Ciclo	79	Sec. con núm. de ident. 0109	GAGCGCUUCCCCGAUGAGA
Ciclo	80	Sec. con núm. de ident. 0110	GCGCUUCCCCGAUGAGAAC
Ciclo	81	Sec. con núm. de ident. 0111	GCUUCCCCGAUGAGAAUU
Ciclo	82	Sec. con núm. de ident. 0112	UUCCCCGAUGAGAAUUA
Ciclo	83	Sec. con núm. de ident. 0113	CCCCGAUGAGAAUUCAAA
Ciclo	84	Sec. con núm. de ident. 0114	CCGAUGAGAAUUCAAACU
Ciclo	85	Sec. con núm. de ident. 0115	GAUGAGAAUUCAAACUGA
Ciclo	86	Sec. con núm. de ident. 0116	UGAGAAUUCAAACUGAAG
Ciclo	87	Sec. con núm. de ident. 0117	AGAAUUCAAACUGAAGCA
Ciclo	88	Sec. con núm. de ident. 0118	AACUUCAAACUGAAGCACU
Ciclo	89	Sec. con núm. de ident. 0119	CUUCAAACUGAAGCACUAC
Ciclo	90	Sec. con núm. de ident. 0120	UCAACUGAAGCACUACGG
DB	1	Sec. con núm. de ident. 0121	ACGGGCAAGGCCAAGUGGG
DB	2	Sec. con núm. de ident. 0122	CGGGCAAGGCCAAGUGGGA
DB	3	Sec. con núm. de ident. 0123	GGGCAAGGCCAAGUGGGAU
DB	4	Sec. con núm. de ident. 0124	GGCAAGGCCAAGUGGGGAUG
DB	5	Sec. con núm. de ident. 0125	GCAAGGCCAAGUGGGGAUGC
DB	6	Sec. con núm. de ident. 0126	CAAGGCCAAGUGGGGAUGCC
DB	7	Sec. con núm. de ident. 0127	AAGGCCAAGUGGGGAUGCCU
DB	8	Sec. con núm. de ident. 0128	AGGCCAAGUGGGGAUGCCUG
DB	9	Sec. con núm. de ident. 0129	GGCCAAGUGGGGAUGCCUGG

ES 2 440 284 T3

DB	10	Sec. con núm. de ident. 0130	GCCAAGUGGGAUGCCUGGA
DB	11	Sec. con núm. de ident. 0131	CCAAGUGGGAUGCCUGGAA
DB	12	Sec. con núm. de ident. 0132	CAAGUGGGAUGCCUGGAAU
DB	13	Sec. con núm. de ident. 0133	AAGUGGGAUGCCUGGAAUG
DB	14	Sec. con núm. de ident. 0134	AGUGGGAUGCCUGGAAUGA
DB	15	Sec. con núm. de ident. 0135	GUGGGAUGCCUGGAAUGAG
DB	16	Sec. con núm. de ident. 0136	UGGGAUGCCUGGAAUGAGC
DB	17	Sec. con núm. de ident. 0137	GGGAUGCCUGGAAUGAGCU
DB	18	Sec. con núm. de ident. 0138	GGAUGCCUGGAAUGAGCUG
DB	19	Sec. con núm. de ident. 0139	GAUGCCUGGAAUGAGCUGA
DB	20	Sec. con núm. de ident. 0140	AUGCCUGGAAUGAGCUGAA
DB	21	Sec. con núm. de ident. 0141	UGCCUGGAAUGAGCUGAAA
DB	22	Sec. con núm. de ident. 0142	GCCUGGAAUGAGCUGAAAAG
DB	23	Sec. con núm. de ident. 0143	CCUGGAAUGAGCUGAAAAGG
DB	24	Sec. con núm. de ident. 0144	CUGGAAUGAGCUGAAAAGGG
DB	25	Sec. con núm. de ident. 0145	UGGAAUGAGCUGAAAAGGGA
DB	26	Sec. con núm. de ident. 0146	GGAUGAGCUGAAAAGGGAC
DB	27	Sec. con núm. de ident. 0147	GAAUGAGCUGAAAAGGGACU
DB	28	Sec. con núm. de ident. 0148	AAUGAGCUGAAAAGGGACUJ
DB	29	Sec. con núm. de ident. 0149	AUGAGCUGAAAAGGGACUUC
DB	30	Sec. con núm. de ident. 0150	UGAGCUGAAAAGGGACUUC
DB	31	Sec. con núm. de ident. 0151	GAGCUGAAAAGGGACUCCA
DB	32	Sec. con núm. de ident. 0152	AGCUGAAAAGGGACUCCAA
DB	33	Sec. con núm. de ident. 0153	GCUGAAAAGGGACUCCAAG
DB	34	Sec. con núm. de ident. 0154	CUGAAAAGGGACUCCAAGG
DB	35	Sec. con núm. de ident. 0155	UGAAAAGGGACUCCAAGGA
DB	36	Sec. con núm. de ident. 0156	GAAAGGGACUCCAAGGAA
DB	37	Sec. con núm. de ident. 0157	AAAGGGACUCCAAGGAAG
DB	38	Sec. con núm. de ident. 0158	AAGGGACUCCAAGGAAGA
DB	39	Sec. con núm. de ident. 0159	AGGGACUCCAAGGAAGAU
DB	40	Sec. con núm. de ident. 0160	GGGACUCCAAGGAAGAUG
DB	41	Sec. con núm. de ident. 0161	GGACUCCAAGGAAGAUGC
DB	42	Sec. con núm. de ident. 0162	GACUCCAAGGAAGAUGCC
DB	43	Sec. con núm. de ident. 0163	ACUCCAAGGAAGAUGCCA
DB	44	Sec. con núm. de ident. 0164	CUCCAAGGAAGAUGCCA
DB	45	Sec. con núm. de ident. 0165	UCCAAGGAAGAUGCCAUG

ES 2 440 284 T3

DB	46	Sec. con núm. de ident. 0166	UCCAAGGAAGAUGCCAUGA
DB	47	Sec. con núm. de ident. 0167	CCAAGGAAGAUGCCAUGAA
DB	48	Sec. con núm. de ident. 0168	CAAGGAAGAUGCCAUGAAA
DB	49	Sec. con núm. de ident. 0169	AAGGAAGAUGCCAUGAAAG
DB	50	Sec. con núm. de ident. 0170	AGGAAGAUGCCAUGAAAGC
DB	51	Sec. con núm. de ident. 0171	GGAAGAUGCCAUGAAAGCU
DB	52	Sec. con núm. de ident. 0172	GAAGAUGCCAUGAAAGCUU
DB	53	Sec. con núm. de ident. 0173	AAGAUGCCAUGAAAGCUUA
DB	54	Sec. con núm. de ident. 0174	AGAUGCCAUGAAAGCUUAC
DB	55	Sec. con núm. de ident. 0175	GAUGCCAUGAAAGCUUACA
DB	56	Sec. con núm. de ident. 0176	AUGCCAUGAAAGCUUACAU
DB	57	Sec. con núm. de ident. 0177	UGCCAUGAAAGCUUACAUC
DB	58	Sec. con núm. de ident. 0178	GCCAUGAAAGCUUACAUCA
DB	59	Sec. con núm. de ident. 0179	CCAUGAAAGCUUACAUCAA
DB	60	Sec. con núm. de ident. 0180	CAUGAAAGCUUACAUCAAC
DB	61	Sec. con núm. de ident. 0181	AUGAAAGCUUACAUCAACA
DB	62	Sec. con núm. de ident. 0182	UGAAAGCUUACAUCAACAA
DB	63	Sec. con núm. de ident. 0183	GAAAGCUUACAUCAACAAA
DB	64	Sec. con núm. de ident. 0184	AAAGCUUACAUCAACAAAG
DB	65	Sec. con núm. de ident. 0185	AAGCUUACAUCAACAAAGU
DB	66	Sec. con núm. de ident. 0186	AGCUUACAUCAACAAAGUA
DB	67	Sec. con núm. de ident. 0187	GCUUACAUCAACAAAGUAG
DB	68	Sec. con núm. de ident. 0188	CUUACAUCAACAAAGUAGA
DB	69	Sec. con núm. de ident. 0189	UUACAUCAACAAAGUAGAA
DB	70	Sec. con núm. de ident. 0190	UACAUCAACAAAGUAGAAG
DB	71	Sec. con núm. de ident. 0191	ACAUCAACAAAGUAGAAGA
DB	72	Sec. con núm. de ident. 0192	CAUCAACAAAGUAGAAGAG
DB	73	Sec. con núm. de ident. 0193	AUCAACAAAGUAGAAGAGC
DB	74	Sec. con núm. de ident. 0194	UCAACAAAGUAGAAGAGCU
DB	75	Sec. con núm. de ident. 0195	CAACAAAGUAGAAGAGCUA
DB	76	Sec. con núm. de ident. 0196	AACAAAGUAGAAGAGCUAA
DB	77	Sec. con núm. de ident. 0197	ACAAAGUAGAAGAGCUAAA
DB	78	Sec. con núm. de ident. 0198	CAAAGUAGAAGAGCUAAAG
DB	79	Sec. con núm. de ident. 0199	AAAGUAGAAGAGCUAAAGA
DB	80	Sec. con núm. de ident. 0200	AAGUAGAAGAGCUAAAGAA
DB	81	Sec. con núm. de ident. 0201	AGUAGAAGAGCUAAAGAAA

ES 2 440 284 T3

DB	82	Sec. con núm. de ident. 0202	GUAGAAGAGCUAAAGAAAA
DB	83	Sec. con núm. de ident. 0203	UAGAAGAGCUAAAGAAAAA
DB	84	Sec. con núm. de ident. 0204	AGAAGAGCUAAAGAAAAAA
DB	85	Sec. con núm. de ident. 0205	GAAGAGCUAAAGAAAAAAU
DB	86	Sec. con núm. de ident. 0206	AAGAGCUAAAGAAAAAAUA
DB	87	Sec. con núm. de ident. 0207	AGAGCUAAAGAAAAAAUAC
DB	88	Sec. con núm. de ident. 0208	GAGCUAAAGAAAAAAUACG
DB	89	Sec. con núm. de ident. 0209	AGCUAAAGAAAAAAUACGG
DB	90	Sec. con núm. de ident. 0210	GCUAAAGAAAAAAUACGGG
Luc	1	Sec. con núm. de ident. 0211	AUCCUCAUAAAGGCCAAGA
Luc	2	Sec. con núm. de ident. 0212	AGAUCUCAUAAAGGCCAA
Luc	3	Sec. con núm. de ident. 0213	AGAGAUCCUCAUAAAGGCC
Luc	4	Sec. con núm. de ident. 0214	AGAGAGAUCCUCAUAAAGG
Luc	5	Sec. con núm. de ident. 0215	UCAGAGAGAUCCUCAUAAA
Luc	6	Sec. con núm. de ident. 0216	AAUCAGAGAGAUCCUCAUA
Luc	7	Sec. con núm. de ident. 0217	AAAAUCAGAGAGAUCCUCA
Luc	8	Sec. con núm. de ident. 0218	GAAAAUCAGAGAGAUCCU
Luc	9	Sec. con núm. de ident. 0219	AAGAAAAUCAGAGAGAUUC
Luc	10	Sec. con núm. de ident. 0220	GCAAGAAAAUCAGAGAGA
Luc	11	Sec. con núm. de ident. 0221	ACGCAAGAAAAUCAGAGA
Luc	12	Sec. con núm. de ident. 0222	CGACGCAAGAAAAUCAGA
Luc	13	Sec. con núm. de ident. 0223	CUCGACGCAAGAAAAUCA
Luc	14	Sec. con núm. de ident. 0224	AACUCGACGCAAGAAAAU
Luc	15	Sec. con núm. de ident. 0225	AAAACUCGACGCAAGAAAA
Luc	16	Sec. con núm. de ident. 0226	GGAAAACUCGACGCAAGAA
Luc	17	Sec. con núm. de ident. 0227	CCGAAAACUCGACGCAAG
Luc	18	Sec. con núm. de ident. 0228	UACCGAAAACUCGACGCA
Luc	19	Sec. con núm. de ident. 0229	CUUACCGAAAACUCGACG
Luc	20	Sec. con núm. de ident. 0230	GUCUUACCGAAAACUCGA
Luc	21	Sec. con núm. de ident. 0231	AGGUCUUACCGAAAACUC
Luc	22	Sec. con núm. de ident. 0232	AAAGGUCUUACCGAAAAC
Luc	23	Sec. con núm. de ident. 0233	CGAAAGGUCUUACCGAAA
Luc	24	Sec. con núm. de ident. 0234	ACCGAAAGGUCUUACCGGA
Luc	25	Sec. con núm. de ident. 0235	GUACCGAAAGGUCUUACCG
Luc	26	Sec. con núm. de ident. 0236	AAGUACCGAAAGGUCUUAC
Luc	27	Sec. con núm. de ident. 0237	CGAAGUACCGAAAGGUCUU

ES 2 440 284 T3

Luc	28	Sec. con núm. de ident. 0238	GACGAAGUACCGAAAGGUC
Luc	29	Sec. con núm. de ident. 0239	UGGACGAAGUACCGAAAGG
Luc	30	Sec. con núm. de ident. 0240	UGUGGACGAAGUACCGAAA
Luc	31	Sec. con núm. de ident. 0241	UUUGUGGACGAAGUACCGA
Luc	32	Sec. con núm. de ident. 0242	UGUUUGUGGACGAAGUACC
Luc	33	Sec. con núm. de ident. 0243	UGUGUUUGUGGACGAAGUA
Luc	34	Sec. con núm. de ident. 0244	GUUGUGUUUGUGGACGAAG
Luc	35	Sec. con núm. de ident. 0245	GAGUUGUGUUUGUGGACGA
Luc	36	Sec. con núm. de ident. 0246	AGGAGUUGUGUUUGUGGAC
Luc	37	Sec. con núm. de ident. 0247	GGAGGAGUUGUGUUUGUGG
Luc	38	Sec. con núm. de ident. 0248	GCGGAGGAGUUGUGUUUGU
Luc	39	Sec. con núm. de ident. 0249	GCGCGGAGGAGUUGUGUUU
Luc	40	Sec. con núm. de ident. 0250	UUGCGCGGAGGAGUUGUGU
Luc	41	Sec. con núm. de ident. 0251	AGUUGCGCGGAGGAGUUGU
Luc	42	Sec. con núm. de ident. 0252	AAAGUUGCGCGGAGGAGUU
Luc	43	Sec. con núm. de ident. 0253	AAAAAGUUGCGCGGAGGAG
Luc	44	Sec. con núm. de ident. 0254	CGAAAAAGUUGCGCGGAGG
Luc	45	Sec. con núm. de ident. 0255	CGCGAAAAAGUUGCGCGGA
Luc	46	Sec. con núm. de ident. 0256	ACCGCGAAAAAGUUGCGCG
Luc	47	Sec. con núm. de ident. 0257	CAACCGCGAAAAAGUUGCG
Luc	48	Sec. con núm. de ident. 0258	AACAACCGCGAAAAAGUUG
Luc	49	Sec. con núm. de ident. 0259	GUAACAACCGCGAAAAAGU
Luc	50	Sec. con núm. de ident. 0260	AAGUAACAACCGCGAAAAA
Luc	51	Sec. con núm. de ident. 0261	UCAAGUAACAACCGCGAAA
Luc	52	Sec. con núm. de ident. 0262	AGUCAAGUAACAACCGCGA
Luc	53	Sec. con núm. de ident. 0263	CCAGUCAAGUAACAACCGC
Luc	54	Sec. con núm. de ident. 0264	CGCCAGUCAAGUAACAACC
Luc	55	Sec. con núm. de ident. 0265	GUCGCCAGUCAAGUAACAA
Luc	56	Sec. con núm. de ident. 0266	ACGUCGCCAGUCAAGUAAC
Luc	57	Sec. con núm. de ident. 0267	UUACGUCCCCAGUCAAGUA
Luc	58	Sec. con núm. de ident. 0268	GAUUACGUCGCCAGUCAAG
Luc	59	Sec. con núm. de ident. 0269	UGGAUUACGUCGCCAGUCA
Luc	60	Sec. con núm. de ident. 0270	CGUGGAUUACGUCGCCAGU
Luc	61	Sec. con núm. de ident. 0271	AUCGUGGAUUACGUCGCCA
Luc	62	Sec. con núm. de ident. 0272	AGAUCGUGGAUUACGUCGC
Luc	63	Sec. con núm. de ident. 0273	AGAGAUCGUGGAUUACGUC

Luc	64	Sec. con núm. de ident. 0274	AAAGAGAUCGUGGAUUACG
Luc	65	Sec. con núm. de ident. 0275	AAAAAGAGAUCGUGGAUUA
Luc	66	Sec. con núm. de ident. 0276	GGAAAAAGAGAUCGUGGAU
Luc	67	Sec. con núm. de ident. 0277	ACGGAAAAAGAGAUCGUGG
Luc	68	Sec. con núm. de ident. 0278	UGACGGAAAAAGAGAUCGU
Luc	69	Sec. con núm. de ident. 0279	GAUGACGGAAAAAGAGAUC
Luc	70	Sec. con núm. de ident. 0280	ACGAUGACGGAAAAAGAGA
Luc	71	Sec. con núm. de ident. 0281	AGACGAUGACGGAAAAAGA
Luc	72	Sec. con núm. de ident. 0282	AAAGACGAUGACGGAAAA
Luc	73	Sec. con núm. de ident. 0283	GGAAAGACGAUGACGGAAA
Luc	74	Sec. con núm. de ident. 0284	ACGGAAAGACGAUGACGGA
Luc	75	Sec. con núm. de ident. 0285	GCACGGAAAGACGAUGACG
Luc	76	Sec. con núm. de ident. 0286	GAGCACGGAAAGACGAUGA
Luc	77	Sec. con núm. de ident. 0287	UGGAGCACGGAAAGACGAU
Luc	78	Sec. con núm. de ident. 0288	UUUGGAGCACGGAAAGACG
Luc	79	Sec. con núm. de ident. 0289	GUUUUGGAGCACGGAAAGA
Luc	80	Sec. con núm. de ident. 0290	UUGUUUUGGAGCACGGAAA
Luc	81	Sec. con núm. de ident. 0291	UGUUGUUUUGGAGCACGGA
Luc	82	Sec. con núm. de ident. 0292	GUUGUUGUUUUGGAGCACG
Luc	83	Sec. con núm. de ident. 0293	CCGUUGUUGUUUUGGAGCA
Luc	84	Sec. con núm. de ident. 0294	CGCCGUUGUUGUUUUGGAG
Luc	85	Sec. con núm. de ident. 0295	GCCGCCGUUGUUGUUUUGG
Luc	86	Sec. con núm. de ident. 0296	CCGCCGCCGUUGUUGUUUU
Luc	87	Sec. con núm. de ident. 0297	UCCCGCCGCCGUUGUUGUU
Luc	88	Sec. con núm. de ident. 0298	CUUCCCGCCGCCGUUGUUG
Luc	89	Sec. con núm. de ident. 0299	AACUCCCGCCGCCGUUGU
Luc	90	Sec. con núm. de ident. 0300	UGAACUCCCGCCGCCGUU

Ejemplo II. Validación del Algoritmo usando DBI, Luciferasa, PLK, EGFR, y SEAP

5 El algoritmo (Fórmula VIII) identificó ARNip para cinco genes, el DBI humano, la luciferasa de luciérnaga (fLuc), la luciferasa de renilla (rLuc), la PLK humana, y la fosfatasa alcalina secretada humana (SEAP). Se seleccionaron cuatro ARNip individuales sobre la base de sus SMARTscores™ derivados del análisis de su secuencia con el uso de la Fórmula VIII (igualmente todos los ARNip podrían seleccionarse con la Fórmula IX) y se analizó su capacidad para silenciar la expresión de sus dianas. Además de la puntuación, se llevó a cabo una búsqueda por BLAST para cada ARNip. Para minimizar los posibles efectos de silenciamiento fuera de la diana, sólo se seleccionaron aquellas secuencias diana con más de tres errores de apareamiento frente a secuencias no relacionadas. Semizarov, y otros, Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 2003, 100:6347. Estas dobles cadenas se analizaron individualmente y en mezclas de 4 y se compararon con varios ARNip que se seleccionaron aleatoriamente. La funcionalidad se midió como porcentaje de la reducción de genes diana en comparación con los controles. Todos los ARNip se transfectaron como se describió mediante los métodos anteriores a una concentración de 100 nM en células HEK293 con el uso de Lipofectamina 2000. El nivel de la expresión de los genes diana se evaluó por B-ADN

como se describió anteriormente y se normalizó con respecto al control no específico. La **Figura 10** muestra que los ARNip seleccionados mediante el algoritmo descrito en la presente invención fueron significativamente más potentes que los ARNip seleccionados aleatoriamente. El algoritmo aumentó las posibilidades de identificar un ARNip F50 de 48% a 91%, y un ARNip F80 de 13% a 57%. Adicionalmente, las mezclas de ARNip SMART silenciaron las dianas seleccionadas mejor que las mezclas seleccionadas aleatoriamente (ver Figura 10F).

Ejemplo III. Validación del Algoritmo con el Uso de Genes Implicados en la Endocitosis Dependiente de Clatrina.

Los componentes de la vía de endocitosis mediada por clatrina son clave para la modulación de la señalización intracelular y juegan funciones importantes en la enfermedad. Se cree que los reordenamientos cromosómicos que resultan en transcritos de fusión entre el gen de la Leucemia de Linaje Mixto (MLL) y el CALM (gen de leucemia mieloide y linfocito de ensamble de Clatrina) juegan una función en la leucemogénesis. De manera similar, las interrupciones en Rab7 y Rab9, así como también HIP 1 (proteína de interacción con la huntingtina), genes que se cree que están implicados en la endocitosis, son potencialmente responsables de las dolencias que resultan en el almacenamiento de lípidos, y enfermedades neuronales, respectivamente. Por estas razones, los ARNip orientados contra la clatrina y otros genes implicados en la vía endocítica mediada por clatrina son herramientas terapéuticas y de investigación potencialmente importantes.

Los ARNip orientados contra los genes implicados en las vías de endocitosis mediadas por clatrina se seleccionaron usando la Fórmula VIII. Los genes diana fueron los de la cadena pesada de la clatrina (CHC, # de acceso NM_004859), la cadena ligera A de la clatrina (CLCa, NM_001833), la cadena ligera B de la clatrina (CLCb, NM_001834), CALM (U45976), la subunidad $\beta 2$ de la AP-2 ($\beta 2$, NM_001282), Eps15 (NM_001981), Eps15R (NM_021235), la dinamina II (DYNII, NM_004945), Rab5a (BC001267), Rab5b (NM_002868), Rab5c (AF141304) y EEA.1 (XM_018197).

Para cada gen, se seleccionaron cuatro dobles cadenas de ARNip con las puntuaciones más altas y se llevó a cabo una búsqueda por BLAST para cada uno de ellos usando la base de datos Human EST. Con el fin de minimizar los posibles efectos de silenciamiento fuera de la diana, se usaron sólo aquellas secuencias con más de tres errores de apareamiento frente a secuencias no relacionadas. Todas las dobles cadenas se sintetizaron de 21-mers en Dharmacon, Inc. con colgantes 3'-UU con el uso de un método modificado de la química 2'-ACE, Scaringe, Advanced 5'-silyl-2'-orthoester approach to RNA oligonucleotide synthesis, Methods Enzymol 2000, 317:3, y la cadena no codificante se fosforiló químicamente para asegurar la actividad máxima.

Las células HeLa se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía 10% de suero fetal bovino, antibióticos y glutamina, las dobles cadenas de ARNip se resuspendieron en tampón Universal 1X para ARNip (Dharmacon, Inc.) hasta 20 μ M antes de la transfección. Las células HeLa se transfectaron dos veces en placas de 12 pocillos con 4 μ l de ARNip bicatenario 20 μ M en 3 μ l del reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos) a intervalos de 24 horas. Para las transfecciones en las que se incluyeron 2 o 3 ARNip bicatenarios, se disminuyó la cantidad de cada doble cadena, de manera que la cantidad total fue la misma que en las transfecciones con los ARNip únicos. Las células se sembraron en medio de cultivo normal 12 horas antes de los experimentos, y los niveles de proteína se midieron 2 o 4 días después de la primera transfección.

Cantidades iguales de lisados se resolvieron por electroforesis, se transfirieron, y se tiñeron con el anticuerpo específico para la proteína diana, así como también con anticuerpos específicos para proteínas no relacionadas, fosfatasa PP 1 y Tsg101 (no mostrado). Las células se lisaron en tampón de solubilización Tritón X-100/glicerol como se describió previamente. Tebar, Bohlander, y Sorkin, Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid Leukemia (CALM) Protein: Localization in Endocytic-coated Pits, Interactions with Clathrin, and the Impact of Overexpression on Clathrin-mediated Traffic, Mol. Biol. Cell agosto 1999, 10:2687. Los lisados celulares se sometieron a electroforesis, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, y la transferencia de tipo Western se realizó con varios anticuerpos seguido por la detección mediante un sistema mejorado de quimioluminiscencia (Pierce, Inc). Varias películas de rayos X se analizaron para determinar el intervalo lineal de las señales de quimioluminiscencia, y las cuantificaciones se realizaron con el uso de densitometría y el programa v5.5 Alphamager (Alpha Innotech Corporation). En experimentos con ARNip dirigidos a Eps15R, los lisados celulares se sometieron a inmunoprecipitación con Ab860, y se detectó Eps15R en los inmunoprecipitados por transferencia de tipo Western como se describió anteriormente.

Los anticuerpos para evaluar los niveles de cada proteína mediante transferencia de tipo Western se obtuvieron de las siguientes fuentes: el anticuerpo monoclonal para la cadena pesada de la clatrina (TD.1) se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, MD, Estados Unidos); el anticuerpo policlonal para la dinamina II se obtuvo de Affinity Bioreagents, Inc. (Golden, CO, Estados Unidos); los anticuerpos monoclonales para EEA.1 y Rab5a se adquirieron de BD Transduction Laboratories (Los Angeles, CA, Estados Unidos); el anticuerpo monoclonal para Tsg101 se adquirió de Santa

- Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, Estados Unidos); el anticuerpo monoclonal para GFP fue de ZYMED Laboratories Inc. (Sur de San Francisco, CA, Estados Unidos); los anticuerpos policlonales de conejo Ab32 específicos para α -adaptinas y Ab20 para CALM se describieron previamente Sorkin, y otros, Stoichiometric Interaction of the Epidermal Growth Factor Receptor with the Clathrin-associated Protein Complex AP-2, J. Biol. Chem. enero 1995, 270:619, los anticuerpos policlonales para las cadenas ligeras A y B de la clatrina fueron amablemente proporcionados por el Dr. F. Brodsky (UCSF); los anticuerpos monoclonales para PP1 (BD Transduction Laboratories) y α -actinina (Chemicon) fueron amablemente proporcionados por el Dr. M. Dell'Acqua (Universidad de Colorado); Ab577 para Eps15 y Ab860 para Eps15R fueron proporcionados amablemente por el Dr PP Di Fiore (Instituto Oncológico Europeo).
- 5 La Figura 11 demuestra la funcionalidad *in vivo* de 48 ARNip individuales, seleccionados con el uso de la Fórmula VIII (la mayoría de ellos cumplen igualmente con los criterios incorporados por la Fórmula IX) dirigidos a 12 genes. Varias líneas celulares se transfectaron con dobles cadenas de ARNip (*Dup1-4*) o mezclas de dobles cadenas de ARNip (Mezcla), y las células se lisaron 3 días después de la transfección con la excepción de CALM (2 días) y β 2 (4 días).
- 15 Tenga en cuenta que una banda de β 1-adaptina (parte del complejo adaptador AP- 1 en Golgi) que corre ligeramente más lento que la β 2 adaptina. CALM tiene dos variantes de empalme, 66 y 72 kD. Se detectó Eps15R de longitud total (un doblete de ~130 kD) y varias formas truncadas empalmadas de ~100 kD y ~70 kD en los inmunoprecipitados de Eps15R (mostrado por las flechas). Las células se lisaron 3 días después de la transfección. Cantidades iguales de lisados se resolvieron mediante electroforesis y se transfirieron con el anticuerpo específico para una proteína diana (anticuerpos GFP para las proteínas de fusión YFP) y el anticuerpo específico para las proteínas no relacionadas fosfatasa PP 1 o α -actinina, y TSG101. La cantidad de proteína en cada banda específica se normalizó con la cantidad de proteínas no específicas en cada carril del gel. Casi todos ellos parecen ser funcionales, lo que establece que la Fórmula VIII y IX pueden usarse para predecir la funcionalidad de los ARNip en general en una amplia manera en el genoma.
- 20 Para generar la fusión de la proteína fluorescente amarilla (YFP) con Rab5b o Rab5c (YFP-Rab5b o YFP-Rab5c), se obtuvo un fragmento de ADN que codifica la Rab5b o Rab5c humanas completas mediante PCR con el uso de la *Pfu* polimerasa (Stratagene) con un sitio de restricción *SacI* introducido en el extremo 5' y un sitio *KpnI* en el extremo 3' y se clonó en vector pEYFP-C1 (CLONTECH, Palo Alto, CA, Estados Unidos). GFP-CALM y YFP-Rab5a se describieron previamente Tebar, Bohlander, y Sorkin, Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid Leukemia (CALM) Protein: Localization in Endocytic-coated Pits, Interactions with Clathrin, and the Impact of Overexpression on Clathrin-mediated Traffic, Mol. Biol. Cell agosto 1999, 10:2687.
- 25 30

Ejemplo IV Validación del Algoritmo usando Eg5, GADPH, ATE1, MEK3, MEK1, QB, Lamina/C, c-myc, ciclofilina humana, y ciclofilina de ratón.

- 35 Se identificó un número de genes que parecen desempeñar funciones potencialmente importantes en la etiología de la enfermedad. Los perfiles de expresión de los riñones normales y enfermos han implicado a Edg5 en la neuropatía por inmunoglobulina A, enfermedad glomerular renal común. Myc1 MEK1/2 y otras quinasas relacionadas se han asociado con uno o más tipos de cáncer, mientras que las laminas se han implicado en la distrofia muscular y otras enfermedades. Por estas razones, los ARNip orientados contra los genes que codifican estas clases de moléculas serían importantes herramientas terapéuticas y de investigación.
- 40

- La Figura 12 ilustra cuatro ARNip dirigidos a 10 genes diferentes (Tabla V para la información de la secuencia y el número de acceso) que se seleccionaron de acuerdo con la Fórmula VIII y se ensayaron como individuales y en mezclas en células HEK293. El nivel de silenciamiento inducido por los ARNip se midió con el uso del ensayo de B-ADN. Estos estudios demostraron que treinta y seis de los cuarenta ARNip individuales seleccionados por SMART probados son funcionales (90%) y todas las 10 mezclas son totalmente funcionales.
- 45

Ejemplo V. Validación del Algoritmo Usando Bcl2

- 50 Bcl-2 es una proteína anti-apoptótica de 205-239 aminoácidos de ~25kD, que contiene considerable homología con otros miembros de la familia BCL que incluyen BCLX, MCL1, BAX, BAD, y BIK. La proteína existe en al menos dos formas (Bcl2a, que tiene una cola hidrofóbica para el anclaje de la membrana, y Bcl2b, que carece de la cola hidrofóbica) y se localiza predominantemente en la membrana mitocondrial. Si bien la expresión de Bcl2 está ampliamente distribuida, se ha centrado un particular interés en la expresión de esta molécula en células B y T. La expresión de Bcl2 es regulada negativamente en células B del centro germinal normal pero en un alto porcentaje de linfomas foliculares, se ha observado que la expresión de Bcl2 está elevada. Los estudios citológicos han identificado una translocación común ((14;18)(q32;q32)) entre un alto porcentaje (>70%) de estos linfomas. Esta lesión genética coloca al gen Bcl2 en yuxtaposición con secuencias codificadoras
- 55

del gen de la cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) y se cree que impone niveles inadecuados de la expresión génica, y resistencia a la muerte celular programada en las células B del centro del folículo. En otros casos, la hipometilación del promotor de Bcl2 conduce a una expresión mejorada y de nuevo, a la inhibición de la apoptosis. Además del cáncer, la expresión no regulada de Bcl-2 se ha correlacionado con la esclerosis múltiple y diversas enfermedades neurológicas.

La correlación entre la translocación de Bcl-2 y el cáncer hace a este gen una diana atractiva para la iARN. La identificación de ARNip orientados contra el transcrito de bcl2 (o fusiones Bcl2-IgH) mejoraría nuestra comprensión de la función del gen Bcl2 y posiblemente proporcione un futuro agente terapéutico para combatir enfermedades que resultan de alteraciones en la expresión o función de este gen.

Identificación in silico de ARNip funcionales

Para identificar ARNip funcionales e hiperfuncionales contra el gen Bcl2, la secuencia de Bcl-2 se descargó de la base de datos Unigene de NCBI y se analizó con el uso del algoritmo de la Fórmula VIII. Como resultado de estos procedimientos, se obtuvieron tanto la secuencia como los SMARTscores™ de los ARNip para Bcl2 y se clasificaron de acuerdo con su funcionalidad. Posteriormente, estas secuencias se compararon por un BLAST (base de datos) para asegurar que las secuencias seleccionadas fueran específicas y contuvieran una superposición mínima con genes no relacionados. Los SMARTscores™ para los 10 mejores ARNip para Bcl-2 se identifican en la Figura 13.

Prueba in vivo de ARNip para Bcl-2

Los ARNip para Bcl-2 con los diez mejores SMARTscores™ se seleccionaron y se probaron en un ensayo funcional para determinar la eficiencia del silenciamiento. Para lograr esto, cada una de las diez dobles cadenas se sintetizó con el uso de la química 2'-O-ACE y se transfectó a concentraciones de 100 nM en las células. Veinticuatro horas más tarde los ensayos se realizaron en extractos celulares para evaluar el grado de silenciamiento de la diana. Los controles usados en estos experimentos incluyeron células con transfecciones simuladas, y células que se transfectaron con una doble cadena de ARNip no específico.

Los resultados de estos experimentos se presentan más abajo (y en la **Figura 14**) y muestran que los diez ARNip seleccionados inducen un silenciamiento de 80% o más del mensaje Bcl2 a concentraciones de 100nM. Estos datos verifican que el algoritmo identifica exitosamente los ARNip para Bcl2 funcionales y proporciona un conjunto de agentes funcionales que pueden usarse en ambientes experimentales y terapéuticos.

ARNip 1	GGGAGAUAGUGAUGAAGUA	Sec. con núm.de ident. 301
ARNip 2	GAAGUACAUCCAUAUAAG	Sec. con núm.de ident. 302
ARNip 3	GUACGACAACCGGGAGAU	Sec. con núm.de ident. 303
ARNip 4	AGAUAGUGAUGAAGUACAU	Sec. con núm.de ident. 304
ARNip 5	UGAAGACUCUGCUCAGUUU	Sec. con núm.de ident. 305
ARNip 6	GCAUGCGGCCUCUGUUUGA	Sec. con núm.de ident. 306
ARNip 7	UGCGGCCUCUGUUUGAUUU	Sec. con núm.de ident. 307
ARNip 8	GAGAUAGUGAUGAAGUACA	Sec. con núm.de ident. 308
ARNip 9	GGAGAUAGUGAUGAAGUAC	Sec. con núm.de ident. 309
ARNip 10	GAAGACUCUGCUCAGUUUG	Sec. con núm.de ident. 310

ARNip para Bcl2: Cadena codificante, 5'→3'

Ejemplo VI. Secuencias Seleccionadas mediante el Algoritmo

Secuencias de los ARNip seleccionadas usando las Fórmulas (Algoritmos) VIII y IX con su correspondiente clasificación, las que se evaluaron para determinar la actividad de silenciamiento *in vivo* en el presente estudio (Fórmula VIII y IX, respectivamente).

ES 2 440 284 T3

TABLA V

Nombre del gen	Número de Acceso	Sec. con núm. de ident.	FTIISeqTence	Fórmula VIII	Fórmula IX
CLTC	NM_004859	Sec. con núm.de ident. 0301	GAAAGAATCTGTAGAGAAA	76	94.2
CLTC	NM_004859	Sec. con núm.de ident. 0302	GCAATGAGCTGTTTGAAGA	65	39.9
CLTC	NM_004859	Sec. con núm.de ident. 0303	TGACAAAGGTGGATAAATT	57	38.2
CLTC	NM_004859	Sec. con núm.de ident. 0304	GGAAATGGATCTCTTTGAA	54	49.4
CLTA	NM_001833	Sec. con núm.de ident. 0305	GGAAAGTAATGGTCCAACA	22	55.5
CLTA	NM_001833	Sec. con núm.de ident. 0306	AGACAGTTATGCAGCTATT	4	22.9
CLTA	NM_001833	Sec. con núm.de ident. 0307	CCAATTCTCGGAAGCAAGA	1	17
CLTA	NM_001833	Sec. con núm.de ident. 0308	GAAAGTAATGGTCCAACAG	-1	-13
CLTB	NM_001834	Sec. con núm.de ident. 0309	GCGCCAGAGTGAACAAGTA	17	57.5
CLTB	NM_001834	Sec. con núm.de ident. 0310	GAAGGTGGCCCAGCTATGT	15	-8.6
CLTB	NM_001834	Sec. con núm.de ident. 0311	GGAACCAGCGCCAGAGTGA	13	40.5
CLTB	NM_001834	Sec. con núm.de ident. 0312	GAGCGAGATTGCAGGCATA	20	61.7
CALM	U45976	Sec. con núm.de ident. 0313	GTTAGTATCTGATGACTTG	36	-34.6
CALM	U45976	Sec. con núm.de ident. 0314	GAAATGGAACCACTAAGAA	33	46.1
CALM	U45976	Sec. con núm.de ident. 0315	GGAAATGGAACCACTAAGA	30	61.2
CALM	U45976	Sec. con núm.de ident. 0316	CAACTACACTTTCCAATGC	28	6.8
EPS15	NM_001981	Sec. con núm.de ident. 0317	CCACCAAGATTTTCATGATA	48	25.2
EPS15	NM_001981	Sec. con núm.de ident. 0318	GATCGGAACTCCAACAAGA	43	49.3
EPS15	NM_001981	Sec. con núm.de ident. 0319	AAACGGAGCTACAGATTAT	39	11.5
EPS15	NM_001981	Sec. con núm.de ident 0320	CCACACAGCATTCTTGTA	33	-23.6
EPS15R	NM_021235	Sec. con núm.de ident. 0321	GAAGTTACCTTGAGCAATC	48	33
EPS15R	NM_021235	Sec. con núm.de ident.	GGACTTGGCCGATCCAGAA	27	33

ES 2 440 284 T3

Nombre del gen	Número de Acceso	Sec. con núm. de ident.	FTIISeqTence	Fórmula VIII	Fórmula IX
		0322			
EPS15R	NM_021235	Sec. con núm.de ident. 0323	GCACTTGGATCGAGATGAG	20	1.3
EPS15R	NM_021235	Sec. con núm.de ident. 0324	CAAAGACCAATTCGCGTTA	17	27.7
DNM2	NM_004945	Sec. con núm.de ident 0325	CCGAATCAATCGCATCTTC	6	-29.6
DNM2	NM_004945	Sec. con núm.de ident. 0326	GACATGATCCTGCAGTTCA	5	-14
DNM2	NM_004945	Sec. con núm.de ident. 0327	GAGCGAATCGTCACCACTT	5	24
DNM2	NM_004945	Sec. con núm.de ident. 0328	CCTCCGAGCTGGCGTCTAC	-4	-63.6
ARF6	AF93885	Sec. con núm.de ident. 0329	TCACATGGTTAACCTCTAA	27	-21.1
ARF6	AF93885	Sec. con núm.de ident. 0330	GATGAGGGACGCCATAATC	7	-38.4
ARF6	AF93885	Sec. con núm.de ident. 0331	CCTCTAACTACAAATCTTA	4	16.9
ARF6	AF93885	Sec. con núm.de ident. 0332	GGAAGGTGCTATCCAAAAT	4	11.5
RAB5A	BC001267	Sec. con núm.de ident. 0333	GCAAGCAAGTCCTAACATT	40	25.1
RAB5A	BC001267	Sec. con núm.de ident 0334	GGAAGAGGAGTAGACCTTA	17	50.1
RAB5A	BC001267	Sec. con núm.de ident. 0335	AGGAATCAGTGTTGTAGTA	16	11.5
RAB5A	BC001267	Sec. con núm.de ident. 0336	GAAGAGGAGTAGACCTTAC	12	7
RAB5B	NM_002868	Sec. con núm.de ident. 0337	GAAAGTCAAGCCTGGTATT	14	18.1
RAB5B	NM_002868	Sec. con núm.de ident. 0338	AAAGTCAAGCCTGGTATTA	6	-17.8
RAB5B	NM_002868	Sec. con núm.de ident. 0339	GCTATGAACGTGAATGATC	3	-21.1
RAB5B	NM_002868	Sec. con núm.de ident. 0340	CAAGCCTGGTATTACGTTT	-7	-37.5
RAB5C	AF141304	Sec. con núm.de ident. 0341	GGAACAAGATCTGTCAATT	38	51.9
RAB5C	AF141304	Sec. con núm.de ident. 0342	GCAATGAACGTGAACGAAA	29	43.7
RAB5C	AF141304	Sec. con núm.de ident. 0343	CAATGAACGTGAACGAAAT	18	43.3
RAB5C	AF141304	Sec. con núm.de ident.	GGACAGGAGCGGTATCACA	6	18.2

ES 2 440 284 T3

Nombre del gen	Número de Acceso	Sec. con núm. de ident.	FTIISeqTence	Fórmula VIII	Fórmula IX
		0344			
EEA1	XM_018197	Sec. con núm.de ident. 0345	AGACAGAGCTTGAGAATAA	67	64.1
EEA1	XM_018197	Sec. con núm.de ident. 0346	GAGAAGATCTTTATGCAAAA	60	48.7
EEA1	XM_018197	Sec. con núm.de ident. 0347	GAAGAGAAATCAGCAGATA	58	457
EEA1	XM_018197	Sec. con núm.de ident. 0348	GCAAGTAACTCAACTAACA	56	72.3
AP2B1	NM_001282	Sec. con núm.de ident. 0349	GAGCTAATCTGCCACATTG	49	-12.4
AP2B1	NM_001282	Sec. con núm.de ident. 0350	GCAGATGAGTTACTAGAAA	44	48.9
AP2B1	NM_001282	Sec. con núm.de ident. 0351	CAACTTAATTGTCCAGAAA	41	28.2
AP2B1	NM_001282	Sec. con núm.de ident. 0352	CAACACAGGATTCTGATAA	33	-5.8
PLK	NM_005030	Sec. con núm.de ident. 0353	AGATTGTGCCTAAGTCTCT	-35	-3.4
PLK	NM_005030	Sec. con núm.de ident. 0354	ATGAAGATCTGGAGGTGAA	0	-4.3
PLK	NM_005030	Sec. con núm.de ident. 0355	TTTGAGACTTCTTGCCTAA	-5	-27.7
PLK	NM_005030	Sec. con núm.de ident. 0356	AGATCACCCCTCCTTAAATA	15	72.3
GAPDH	NM_002046	Sec. con núm.de ident. 0357	CAACGGATTTGGTCGTATT	27	-2.8
GAPDH	NM_002046	Sec. con núm.de ident. 0358	GAAATCCCATCACCATCTT	24	3.9
GAPDH	NM_002046	Sec. con núm.de ident. 0359	GACCTCAACTACATGGTTT	22	-22.9
GAPDH	NM_002046	SEQ con núm. de ident. 0360	TGGTTTACATGTTCCAATA	9	9.8
c-Myc		Sec. con núm. de ident. 0361	GAAGAAATCGATGTTGTTT	31	-11.7
c-Myc		Sec. con núm. de ident. 0362	ACACAAACTTGAACAGCTA	22	51.3
c-Myc		Sec. con núm. de ident. 0363	GGAAGAAATCGATGTTGTT	18	26
c-Myc		Sec. con núm. de ident. 0364	GAAACGACGAGAACAGTTG	18	-8.9
MAP2K1	NM_002755	Sec. con núm. de ident. 0365	GCACATGGATGGAGGTTCT	26	16

ES 2 440 284 T3

Nombre del gen	Número de Acceso	Sec. con núm. de ident.	FTIISeqTence	Fórmula VIII	Fórmula IX
MAP2K1	NM_002755	Sec. con núm. de ident. 0366	GCAGAGAGAGCAGATTTGA	16	0.4
MAP2K1	NM_002755	Sec. con núm. de ident. 0367	GAGGTTCTCTGGATCAAGT	14	15.5
MAP2K1	NM_002755	Sec. con núm. de ident. 0368	GAGCAGATTTGAAGCAACT	14	18.5
MAP2K2	NM_030662	Sec. con núm. de ident. 0369	CAAAGACGATGACTTCGAA	37	26.4
MAP2K2	NM_030662	Sec. con núm. de ident. 0370	GATCAGCATTTGCATGGAA	24	-0.7
MAP2K2	NM_030662	Sec. con núm. de ident. 0371	TCCAGGAGTTTGCAATAA	17	-4.5
MAP2K2	NM_030662	Sec. con núm. de ident. 0372	GGAAGCTGATCCACCTTGA	16	59.2
KNSL1(EG5)	NM_004523	Sec. con núm. de ident. 0373	GCAGAAATCTAAGGATATA	53	35.8
KNSL1(EG5)	NM_004523	Sec. con núm. de ident. 0374	CAACAAGGATGAAGTCTAT	50	18.3
KNSL1(EG5)	NM_004523	Sec. con núm. de ident. 0375	CAGCAGAAATCTAAGGATA	41	32.7
KNSL1(EG5)	NM_004523	Sec. con núm. de ident. 0376	CTAGATGGCTTTCTCAGTA	39	3.9
Ciclofilina A_	NM_021130	Sec. con núm. de ident. 0377	AGACAAGGTCCCAAAGACA	-16	58.1
Ciclofilina A_	NM_021130	Sec. con núm. de ident. 0378	GGAATGGCAAGACCAGCAA	-6	36
Ciclofilina A_	NM_021130	Sec. con núm. de ident. 0379	AGAATTATTCCAGGGTTTA	-3	16.1
Ciclofilina A_	NM_021130	Sec. con núm. de ident. 0380	GCAGACAAGGTCCCAAAGA	8	8.9
LAMIN A/C	NM_170707	Sec. con núm. de ident. 0381	AGAAGCAGCTTCAGGATGA	31	38.8
LAMIN A/C	NM_170707	Sec. con núm. de ident. 0382	GAGCTTGACTTCCAGAAGA	33	22.4
LAMINA A/C	NM_170707	Sec. con núm. de ident. 0383	CCACCGAAGTTCACCCTAA	21	27.5
LAMINA A/C	NM_170707	Sec. con núm. de ident. 0384	GAGAAGAGCTCCTCCATCA	55	30.1
Ciclofilina B	M60857	Sec. con núm. de ident. 0385	GAAAGAGCATCTACGGTGA	41	83.9
Ciclofilina B	M60857	Sec. con núm. de ident. 0386	GAAAGGATTTGGCTACAAA	53	59.1
Ciclofilina B	M60857	Sec. con núm. de ident.	ACAGCAAATTCATCGTGT	-20	28.8

ES 2 440 284 T3

Nombre del gen	Número de Acceso	Sec. con núm. de ident.	FTIISeqTence	Fórmula VIII	Fórmula IX
		0387			
Ciclofilina B	M60857	Sec. con núm. de ident. 0388	GGAAAGACTGTTCCAAAAA	2	27
DBI1	NM_020548	Sec. con núm. de ident. 0389	CAACACGCCTCATCCTCTA	27	-7.6
DBI2	NM_020548	Sec. con núm. de ident. 0390	CATGAAAGCTTACATCAAC	25	-30.8
DBI3	NM_020548	Sec. con núm. de ident. 0391	AAGATGCCATGAAAGCTTA	17	22
DBI4	NM_020548	Sec. con núm. de ident. 0392	GCACATACCGCCTGAGTCT	15	3.9
rLuc1		Sec. con núm. de ident. 0393	GATCAAATCTGAAGAAGGA	57	49.2
rLuc2		Sec. con núm. de ident. 0394	GCCAAGAAGTTTCCTAATA	50	13.7
rLuc3		Sec. con núm. de ident. 0395	CAGCATATCTTGAACCATT	41	-2.2
rLuc4		Sec. con núm. de ident. 0396	GAACAAAGGAAACGGATGA	39	29.2
SeAP1	NM_031313	Sec. con núm. de ident. 0397	CGGAAACGGTCCAGGCTAT	6	26.9
SeAP2	NM_031313	Sec. con núm. de ident. 0398	GCTTCGAGCAGACATGATA	4	-11.2
SeAP3	NM_031313	Sec. con núm. de ident. 0399	CCTACACGGTCCCTCCTATA	4	4.9
SeAP4	NM_031313	Sec. con núm. de ident. 0400	GCCAAGAACCTCATCATCT	1	-9.9
fLUC1		Sec. con núm. de ident. 0401	GATATGGGCTGAATACAAA	54	40.4
fLUC2		Sec. con núm. de ident. 0402	GCACTCTGATTGACAAATA	47	54.7
fLUC3		Sec. con núm. de ident. 0403	TGAAGTCTCTGATTAAGTA	46	34.5
fLUC4		Sec. con núm. de ident. 0404	TCAGAGAGATCCTCATAAA	40	11.4
mCyclo_1	NM_008907	Sec. con núm. de ident. 0405	GCAAGAAGATCACCATTTTC	52	46.4
mCyclo_2	NM_008907	Sec. con núm. de ident. 0406	GAGAGAAATTTGAGGATGA	36	70.7
mCyclo_3	NM_008907	Sec. con núm. de ident. 0407	GAAAGGATTTGGCTATAAG	35	-1.5
mCyclo_4	NM_008907	Sec. con núm. de ident. 0408	GAAAGAAGGCATGAACATT	27	10.3

Nombre del gen	Número de Acceso	Sec. con núm. de ident.	FTIISeqTence	Fórmula VIII	Fórmula IX
BCL2_1	NM_000633	Sec. con núm. de ident. 0409	GGGAGATAGTGATGAAGTA	21	72
BCL2_2	NM_000633	Sec. con núm. de ident. 0410	GAAGTACATCCATTATAAG	1	3.3
BCL2_3	NM_000633	Sec. con núm. de ident. 0411	GTACGACAACCGGGAGATA	1	35.9
BCL2_4	NM_000633	Sec. con núm. de ident. 0412	AGATAGTGATGAAGTACAT	-12	22.1
BCL2_5	NM_000633	Sec. con núm. de ident. 0413	TGAAGACTCTGCTCAGTTT	36	19.1
BCL2_6	NM_000633	Sec. con núm. de ident. 0414	GCATGCGGCCTCTGTTTGA	5	-9.7
QB1	NM_003365.1	Sec. con núm. de ident. 0415	GCACACAGCUUACUACAUC	52	-4.8
QB2	NM_003365.1	Sec. con núm. de ident. 0416	GAA AUGCCCUGGUAUCUCA	49	22.1
QB3	NM_003365.1	Sec. con núm. de ident. 0417	GAAGGAACGUGAUGUGAUC	34	22.9
QB4	NM_003365.1	Sec. con núm. de ident. 0418	GCACUACUCCUGUGUGUGA	28	20.4
ATE1-1	NM_007041	Sec. con núm. de ident. 0419	GAACCCAGCUGGAGAACUU	45	15.5
ATE1-2	NM_007041	Sec. con núm. de ident. 0420	GAUAUACAGUGUGAUCUUA	40	12.2
ATE1-3	NM_007041	Sec. con núm. de ident. 0421	GUACUACGAUCCUGAUUUAU	37	32.9
ATE1-4	NM_007041	Sec. con núm. de ident. 0422	GUGCCGACCUUACAAUUU	35	18.2
EGFR-1	NM_005228	Sec. con núm. de ident. 0423	GAAGGAAACTGAATTCAA	68	79.4
EGFR-1	NM_005228	Sec. con núm. de ident. 0424	GGAAATATGTACTACGAAA	49	49.5
EGFR-1	NM_005228	Sec. con núm. de ident. 0425	CCACAAAGCAGTGAATTTA	41	7.6
EGFR-1	NM_005228	Sec. con núm. de ident. 0426	GTAACAAGCTCACGCAGTT	40	25.9

Ejemplo VII Evidencia de los Beneficios de la Mezcla

5 La evidencia de los beneficios de la mezcla se demostró usando el gen reportero, luciferasa. Noventa dobles cadenas de ARNip se sintetizaron con el uso de la química ACE® propiedad de Dharmacon contra uno de los genes reporteros estándar: la luciferasa de luciérnaga. Las dobles cadenas se diseñaron para comenzar con una separación de dos pares de bases y para cubrir aproximadamente 180 pares de bases del gen de la luciferasa (ver secuencias en la **Tabla III**). Posteriormente, las dobles cadenas de ARNip se co-transfectaron con un plásmido que expresa el gen reportero de la

luciferasa en células HEK293 con el uso de protocolos de transfección estándar y la actividad de la luciferasa se ensayó a las 24 y 48 horas.

La transfección de ARNip individuales mostró una distribución estándar del efecto inhibitorio. Algunas dobles cadenas estaban activas, mientras que otras no. La **Figura 15** representa un tamizaje típico de noventa dobles cadenas de ARNip (sec. con núm. de ident. 0032-0120) posicionados con una separación de dos pares de bases. Como sugiere la figura, la funcionalidad de los ARNip bicatenarios se determina más por una secuencia particular del oligonucleótido que por la posición relativa del oligonucleótido dentro de un gen o una parte excesivamente sensible del ARNm, lo que es importante para la tecnología tradicional no codificante.

Cuando dos oligonucleótidos continuos se mezclaron, se observó un aumento significativo en la actividad de silenciamiento génico. (Ver **Figura 16**). Se observó un aumento gradual en la eficiencia y la frecuencia de la funcionalidad de las mezclas cuando el número de ARNip aumentó a 3 y 4. (**Figuras 16, 17**). Más aún, la posición relativa de los oligonucleótidos dentro de una mezcla no determinó si una mezcla en particular era funcional (ver **Figura 18**, en la que el 100% de las mezclas de oligonucleótidos distanciadas por 2, 10 y 20 pares de bases eran funcionales).

Sin embargo, la posición relativa puede no obstante tener un impacto. Puede existir un aumento de la funcionalidad cuando los ARNip se colocan de manera opuesta y continua (el extremo 5' de uno directamente adyacente al extremo 3' de los otros).

Además, las mezclas de ARNip que se probaron se desempeñaron al menos tan bien como el mejor oligonucleótido en la mezcla, bajo las condiciones experimentales cuyos resultados se representan en la **Figura 19**. Por otra parte, cuando se mezclaron dobles cadenas de ARNip no funcionales y marginalmente (semi) funcionales previamente identificados y se mezclaron juntos en grupos de cinco a la vez, se observó una acción cooperativa funcional significativa. (Ver **Figura 20**). De hecho, las mezclas de oligonucleótidos semi-activos fueron de 5 a 25 veces más funcionales que el oligonucleótido más potente en la mezcla. Por lo tanto, la mezcla de varias dobles cadenas de ARNip no interfiere con la funcionalidad de los ARNip más potentes dentro de una mezcla, y el mezclado proporciona un aumento significativo inesperado en la funcionalidad global.

Ejemplo VIII Mezclado entre Especies

Los experimentos se realizaron para los siguientes genes: β -galactosidasa, luciferasa de Renilla, y fosfatasa alcalina secretada, lo que demuestra los beneficios del mezclado. (ver **Figura 21**). Aproximadamente el 50% de los ARNip individuales diseñados para silenciar los genes anteriormente especificados fueron funcionales, mientras que el 100% de las mezclas que contienen las mismas dobles cadenas de ARNip fueron funcionales.

Ejemplo IX ARNip Altamente Funcionales

Las mezclas de cinco ARNip en las que cada par de ARNip traslapan 10-90% resultaron en entidades funcionales 98% (>80% de silenciamiento). Las mezclas de ARNip distribuidos por todo el ARNm que estaban espaciadas uniformemente, cubriendo un intervalo aproximado de 20-2000 pares de bases, fueron además funcionales. Cuando las mezclas de ARNip se colocaron de manera opuesta y continua con respecto a las secuencias de ARNm e imitaron los productos naturales de ARN largos bicatenarios escindidos por Dicer, 98% de las mezclas evidenciaron una actividad altamente funcional (> 95% de silenciamiento).

Ejemplo X. Mezclas de Muestras de ARNip y su Aplicación a Enfermedades Humanas

La base genética detrás de las enfermedades humanas está bien documentada y los ARNip pueden usarse tanto como herramientas de investigación o diagnóstico que como agentes terapéuticos, ya sea individualmente como en mezclas. Los genes implicados en la transducción de la señal, la respuesta inmune, la apoptosis, la reparación del ADN, el control del ciclo celular, y una variedad de otras funciones fisiológicas tienen relevancia clínica y los agentes terapéuticos que pueden modular la expresión de estos genes pueden aliviar algunos o todos los síntomas asociados. En algunos casos, estos genes pueden describirse como un miembro de una familia o clase de genes y los ARNip (diseñados de manera aleatoria, convencional, o racional) pueden estar orientados contra uno o múltiples miembros de la familia para inducir un resultado deseado.

Para identificar ARNip diseñados de manera racional para cada gen, la secuencia se analizó con el uso de la fórmula VIII para identificar una mezcla SMART que contuviera las secuencias funcionales. Para confirmar la actividad de estas

secuencias, los ARNip se introducen en un tipo celular de elección (*por ejemplo*, células HeLa, células HEK293) y los niveles del mensaje apropiado se analizan con el uso de una de varias técnicas probadas en la materia. Los ARNip que tienen niveles elevados de potencia pueden identificarse al probar cada una de las dobles cadenas antes mencionados en concentraciones cada vez más limitantes. De manera similar, los ARNip que tienen niveles aumentados de longevidad pueden identificarse mediante la introducción de cada doble cadena en células y probando la funcionalidad a las 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, y 192 horas después de la transfección. Los agentes que inducen un silenciamiento >95% a concentraciones sub-nanomolares y/o inducen niveles funcionales de silenciamiento durante >96 horas se consideran hiperfuncionales.

Los siguientes son ejemplos no limitantes de familias de proteínas contra las que están dirigidos los ARNip descritos en este documento:

Vías dianas.

Además de dirigir los ARNip contra uno o varios miembros de una familia de proteínas, los ARNip pueden orientarse contra los miembros de una vía. Así, por ejemplo, los ARNip pueden orientarse contra miembros de una vía de transducción de señales (*por ejemplo* la vía de la insulina, que incluye AKT1-3, CBL, CBLB, EIF4EBP1, FOXO1A, FOXO3A, FRAP1, GSK3A, GSK3B, IGF1, IGF1R, INPP5D, INSR, IRS1, MLLT7, PDKP1, PIK3CA, PIK3CB, PIK3R1, PIK3R2, PPP2R2B, PTEN, RPS6, RPS6KA1, RPX6KA3, SGK, TSC1, TSC2, y XPO1), una vía apoptótica (CASP3,6,7,8,9, DSH1/2, P110, P85, FDK1/2, CATENINA, HSP90, CDC37, P23, BAD, BCLXL, BCL2, SMAC, y otras), vías implicadas en el daño del ADN, ciclo celular, y otras fisiológicas (p53,MDM2, CHK1/2, BRCA1/2, ATM, ATR, P15INK4, P27, P21, SKP2, CDC25C/A, 14-3-3, PLK, RB, CDK4, GLUT4, Inos, Mtor, FKBP, PPAR, RXR, ER). De manera similar, los genes implicados en la función del sistema inmune que incluyen TNFR1, IL-1R, IRAK1/2, TRAF2, TRAF6, TRADD, FADD, IKKε, IKKγ, IKKβ, IKKα, IκBα, IκBβ, p50, p65, Rac, RhoA, Cdc42, ROCK, Pak1/2/3/4/5/6 clAP, HDAC1/2, CBP, β-TrCP, Rip2/4, y otros son además dianas importantes para los ARNip descritos en este documento y pueden ser útiles para tratar trastornos del sistema inmune. Los genes implicados en la apoptosis, tales como Dsh1/2, PTEN, P110 (pan), P85, PDK1/2, Akt1 Akt2, Akt (pan), p70^{S6K}, GSK3β, PP2A (cat), β-catenina, HSP90, Cdc37/p50, P23, Bad, BclXL, Bcl2, Smac/Diablo, y Ask1 son potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades que implican defectos en la muerte celular programada (*por ejemplo* cáncer), mientras que los agentes del ARNip orientados contra p53, MDM2, Chk1/2, BRCA1/2, ATM, ATR, p15^{INK4}, P27, P21, Skp2, Cdc25C/A, 14-3-3σ/ε, PLK, Rb, Cdk4, Glut4, iNOS, mTOR, FKBP, PPARγ, RXRα, ERα y genes relacionados pueden desempeñar una función crítica para combatir enfermedades asociadas con interrupciones en la reparación de ADN, y anomalías del ciclo celular.

La Tabla VI más abajo proporciona ejemplos de una mezcla útil para inhibir tp53. Esta mezcla particular es particularmente útil en seres humanos, pero sería útil en cualquier especie que genere un ARNip apropiadamente homólogo. Más aún, dentro de la mezcla enumerada una secuencia cualquiera puede usarse de manera independiente, pero preferentemente están presentes al menos dos de las secuencias enumeradas, con mayor preferencia al menos tres, y con la máxima preferencia todas las secuencias enumeradas para tp53.

Tabla VI

TP53						
TP53	NM_000546	8400737	7157	D-003329-05	GAGGTTGGCTCTGACTGTA	1353
TP53	NM_000546	8400737	7157	D-003329-06	CAGTCTACCTCCCGCCATA	1354
TP53	NM_000546	8400737	7157	D-003329-07	GCACAGAGGAAGAGAATCT	1355
TP53	NM_000546	8400737	7157	D-003329-08	GAAGAAACCACTGGATGGA	1356

Ejemplo XI: Validación de la Anulación de Múltiples Genes con el Uso de Rab5 y Eps

Dos o más genes que tengan funciones similares superpuestas, conducen frecuentemente a una redundancia genética. Las mutaciones que anulan sólo uno de, *por ejemplo*, un par de tales genes (conocidos además como homólogos) resultan en poco o ningún fenotipo debido al hecho de que el gen intacto restante es capaz de cumplir con la función de la contraparte interrumpida. Para entender completamente la función de tales genes en la fisiología celular, frecuentemente es necesario anular o reducir ambos homólogos simultáneamente. Desafortunadamente, la reducción concomitante de dos o más genes frecuentemente es difícil de alcanzar en los organismos superiores (*por ejemplo* en ratones) así que es necesario introducir nuevas tecnologías para examinar detenidamente la función del gen. Uno de estos enfoques para reducir varios genes

simultáneamente es el uso de ARNip. Por ejemplo, la **Figura 11** mostró que los ARNip diseñados de manera racional orientados contra un número de genes implicados en la vía de endocitosis mediada por clatrina resultó en niveles significativos de reducción de la proteína (*por ejemplo*, >80%). Para determinar los efectos de la reducción génica en la endocitosis relacionada con clatrina, se llevaron a cabo ensayos de internalización con el uso del factor de crecimiento epidérmico y la transferrina. Específicamente, el EGF con calidad para unirse al receptor de ratón (Collaborative Research Inc.) y la transferrina humana saturada con hierro (Sigma) se usaron como se describió anteriormente (Jiang, X., Huang, F., Marusyk, A. & Sorkin, A. (2003) *Mol Biol Cell* 14, 858-70). Las células HeLa cultivadas en placas de 12 pocillos se incubaron con EGF-¹²⁵I (1 ng/ml) o transferrina-¹²⁵I (1 µg/ml) en medio de unión (DMEM, 0.1 % de albúmina sérica bovina) a 37°C, y se determinó la relación de radiactividad internalizada y superficial durante un transcurso de tiempo de 5 minutos para calcular la constante específica de la velocidad de internalización k_e como se describió previamente (Jiang, X y otros). Las mediciones de las captaciones de la transferrina y el EGF radiomarcados se realizaron con el uso de ensayos de corto tiempo para evitar la influencia del reciclaje en la cinética de captación, y con el uso de una baja concentración de ligando para evitar la saturación de la vía dependiente de clatrina (para el EGF Lund, K. A., Opresko, L. K., Strarback, C., Walsh, B. J. & Wiley, H. S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 15713-13723).

Los efectos de reducir Rab5a, 5b, 5c, Eps, o Eps 15R (individualmente) se muestran en la **Figura 22** y demuestran que la interrupción de genes únicos tiene poco o ningún efecto sobre la internalización del EGF o la Tfn. En contraste, la reducción simultánea de Rab5a, 5b, y 5c, o de Eps y Eps 15R, conduce a un fenotipo distinto (nota: la concentración total de ARNip en estos experimentos se mantuvo constante con respecto a las de los experimentos en los que se introdujo un único ARNip, ver **Figura 23**). Estos experimentos demuestran la efectividad de la utilización de ARNip diseñados de manera racional para reducir múltiples genes y validan la utilidad de estos reactivos para eludir la redundancia genética.

Ejemplo XII. Validación del Direccionamiento a Múltiples Genes usando G6PD, GAPDH, PLK y UQC.

Una demostración adicional de la capacidad de reducir la expresión de múltiples genes con el uso de ARNip diseñados de manera racional se realizó con mezclas de ARNip orientados contra cuatro genes separados. Para alcanzar esto, los ARNip se transfectaron en células (concentración total de ARNip de 100nM) y se ensayaron veinticuatro horas más tarde por B-ADN. Los resultados mostrados en la **Figura 24** muestran que las mezclas de moléculas diseñadas de manera racional son capaces de silenciar simultáneamente cuatro genes diferentes.

Ejemplo XIII. Validación de Reducciones de Múltiples Genes Demostradas mediante el Perfil de Expresión Génica, un Ejemplo Profético

Para demostrar más aún la capacidad de reducir concomitantemente la expresión de múltiples genes diana, los ARNip únicos o las mezclas de ARNip orientados contra una colección de genes (*por ejemplo* 4, 8, 16, o 23 dianas diferentes) se transfectan simultáneamente en las células y se cultivan durante veinticuatro horas. Posteriormente, el ARNm se extrae de las células tratadas (y no tratadas) y se marca con una de dos sondas con colorantes fluorescentes (*por ejemplo* una sonda fluorescente roja para las células tratadas, una sonda fluorescente verde para las células control). Cantidades equivalentes de ARN marcado de cada muestra se mezcla después y se hibrida a las secuencias que se han unido a un soporte sólido (*por ejemplo* un portaobjetos, "un chip de ADN"). Luego de la hibridación, los portaobjetos se lavan y se analizan para evaluar los cambios en los niveles de los genes diana inducidos por los ARNip.

Ejemplo XIV. Identificación de ARNip hiperfuncionales

Identificación de ARNip hiperfuncionales para Bcl-2

Los diez ARNip para Bcl2 diseñados de manera racional (identificados en la **Figura 13,14**) se probaron para identificar reactivos hiperpotentes. Para lograr esto, cada uno de los diez ARNip para Bcl-2 se transfectaron individualmente en células a concentraciones de 300pM (0.3nM). Veinticuatro horas más tarde, los niveles de transcritos se evaluaron mediante ensayos de B-ADN y se compararon con los controles pertinentes. Como se muestra en la **Figura 25**, mientras que la mayoría de los ARNip para Bcl-2 no indujeron niveles funcionales de silenciamiento a esta concentración, los ARNip 1 y 8 indujeron un >80% de silenciamiento, y el ARNip 6 exhibió un silenciamiento mayor que 90% a esta concentración subnanomolar.

Ejemplo XV. Silenciamiento Génico: Ejemplo profético

Más abajo se muestra un ejemplo de cómo se podría transfectar una célula.

a. Seleccione una línea celular. La selección de una línea celular se determina usualmente mediante la aplicación deseada. La característica más importante para la iARN es el nivel de expresión del gen de interés. Es muy recomendable usar líneas celulares para las que se han especificado y validado las condiciones de transfección con ARNip.

b. Coloque las células en placas. Aproximadamente 24 horas antes de la transfección, coloque en placa las células a la densidad adecuada de manera que sean 70 - 90% confluentes aproximadamente, o aproximadamente 1×10^5 células/ml en el momento de la transfección. Las densidades celulares que son demasiado bajas pueden conducir a una toxicidad debida a una exposición y captación excesivas de los complejos reactivos de transfección-ARNip. Las densidades celulares que son demasiado altas pueden conducir a eficiencias de transfección bajas y poco o ningún silenciamiento. Incube las células durante la noche. Las condiciones de incubación estándar para células de mamíferos son 37°C en 5% de CO₂. Otros tipos de células, tales como células de insecto, requieren diferentes temperaturas y concentraciones de CO₂ que son fácilmente determinables por aquellos con experiencia en la técnica. Utilice condiciones adecuadas para el tipo de célula de interés.

c. Resuspensión de ARNip. Adicione 20 µl de tampón universal de ARNip a cada ARNip para generar una concentración final de 50 µM.

d. Formación del complejo ARNip-lípido. Utilice soluciones y tubos libres de RNasa. Con el uso de la siguiente tabla, Tabla XI:

Tabla XI			
		96-pocillos	24-pocillos
Mezcla 1 (mezcla de la dilución TransIT-TKO-plásmido)			
	Opti-MEM	9.3 µl	46.5 µl
	TransIT-TKO (1 µg/µl)	05 µl	2.5 µl
	Mezcla 1 Volumen Final	10.0 µl	50.0 µl
Mezcla 2 (mezcla de la dilución de ARNip)			
	Opti-MEM	9.0 µl	45.0 µl
	ARNip (1 µM)	1.0 µl	5.0 µl
	Mezcla 2 Volumen Final	10.0 µl	50.0 µl
Mezcla 3 (mezcla reactiva de transfección-ARNip)			
	Mezcla 1	10 µl	50 µl
	Mezcla 2	10 µl	50 µl
	Mezcla 3 Volumen Final	20 µl	100 µl
Incube 20 minutos a temperatura ambiente.			
Mezcla 4 (mezcla de medio-ARNip/reactivo de transfección)			
	Mezcla 3	20 µl	100 µl
	Medio completo	80 µl	400 µl
	Mezcla 4 Volumen Final	100 µl	500 µl
Incube 48 horas a 37°C.			

5 Transfección. Cree una Mezcla 1 mediante la combinación de cantidades específicas de medios libres de suero OPTI-MEM y reactivo de transfección en un tubo de poliestireno estéril. Cree una Mezcla 2 mediante la combinación de cantidades específicas de cada ARNip con medios OPTI -MEM en tubos estériles de 1 ml. Cree una Mezcla 3 mediante la combinación de cantidades específicas de la Mezcla 1 y la Mezcla 2. Mezcle suavemente (no lo agite vigorosamente) e incube a temperatura ambiente por 20 minutos Cree una Mezcla 4 mediante la combinación de cantidades específicas de la Mezcla 3 para completar los medios. Añada un volumen adecuado a cada pocillo de cultivo celular. Incube las células con la Mezcla de reactivo de transfección por 24-72 horas a 37°C. Este tiempo de incubación es flexible. La relación de silenciamiento se mantendrá consistente en cualquier momento en el período de tiempo. Ensaye el silenciamiento génico usando de un método de detección adecuado tal como RT-PCR, análisis de Membrana de Western, inmunohistoquímica, análisis fenotípico, espectrometría de masa, fluorescencia, desintegración radiactiva, o cualquier otro método que se conoce ahora o que llegue a conocerse por aquellos con experiencia en la técnica y que a partir de la lectura de esta descripción sería útil con la presente invención. La ventana óptima para observar la reducción de un fenotipo está relacionada con la tasa de recambio del ARNm del gen de interés, aunque 24-72 horas es lo estándar. El volumen final refleja la cantidad necesaria en cada pocillo para el formato de cultivo celular deseado. Al ajustar los volúmenes para una Mezcla Madre, debe usarse 10% adicional para dar cabida a la variabilidad en el pipeteo, etc. Cuando sea posible deben llevarse a cabo ensayos por duplicado o triplicado.

Extracto de la Tabla XIII (Tabla 13.txt)

ID	ID de la Mezcla de ARNip	Codificante	Pos. Inicial	Puntuación del Blast	Puntuación Ajust.	Selección de la mezcla
4038364	57108	GAAAUGUUCUUGCAGUUA	1695	17	102	0
4038365	57108	GGACAUACCAGCUUAGAUU	1638	15	96	1
4038366	57108	GAAAUUUGCGUGUGGAGUA	847	15	92	1
4038367	57108	GCAGUUAAGGGUAGUUUA	1706	15	90	1
4038368	57108	GCUCAAGACUGGCGCUAAA	79	17	90	0
4038369	57108	GAGAAUUAUUACCCUUCA	1225	18	89	0
4038370	57108	GAGGUUGGCUCUGACUGUA	921	15	85	1
4038371	57108	GAAGCUGUCCUCAUGUUG	1777	17	84	0
4038372	57108	GGGCUCCACUGAACAGUU	1576	16	84	0
4038373	57108	GAGGGUUAUGAAUUAUG	1867	16	83	0
4038374	57108	GGACUCCAUUUGCUUUGU	1553	17	83	0
4038375	57108	CGUCUGGGCUUCUUGCAUU	579	17	82	0
4038376	57108	AGAUGAAGCUCCAGAAUG	431	18	82	0
4038377	57108	GCACAGAGGAAGAGAAUCU	1099	16	82	0
4038378	57108	UGUGAGGGUUAUGAAUA	1864	15	82	0
4038379	57108	GCACCAGGACUCCAUUU	1546	16	81	0
4038380	57108	GAAGAAACCACUGGAUGGA	1208	16	81	0
4038381	57108	CCAAGCAAUGGAUGAUUU	361	16	81	0
4038382	57108	GUGCUGGGAUUACAAUUGU	2466	18	80	0
4038383	57108	GAAACCACUUUUUAUUACA	1899	16	80	0
4038384	57108	GUACCACCAUCCACUACAA	937	17	80	0
4038385	57108	GUUAAGGGUUAUUUACAA	1709	15	80	0

ES 2 440 284 T3

ID	ID de la Mezcla de ARNip	Codificante	Pos. Inicial	Puntuación del Blast	Puntuación Ajust.	Selección de la mezcla
4038386	57108	GGAGAUGUAAGAAAUGUUC	1685	16	80	0
4038387	57108	AGACUGACAUUCUCCACUU	1427	16	80	0
4038388	57108	GCUCAGGGUCAUUUCUUU	2173	18	79	0
4038389	57108	GAGGAUUUCAUCUCUUGUA	2120	16	79	0
4038390	57108	GCCCAUAUCUGUGAAAUGC	1815	17	79	0
4038391	57108	GGAGUGGAGUGGCGUGAUC	2254	18	78	0
4038392	57108	GAAUAAUUCACCCUUCAGA	1227	17	78	0
4038393	57108	AGUAGGACAUACCAGCUUA	1634	16	78	0
4038394	57108	GGAAUUUCAUCUCUUGUAUA	2122	16	77	0
4038395	57108	CAUACCAGCUUAGAUUUUA	1641	17	77	0
4038396	57108	CAGUCUACCUCCGCCAUA	1374	15	77	0
4038397	57108	GACAUACCAGCUUAGAUUU	1639	15	76	0
4038398	57108	GCAAGCACAUUCGCAUUUU	2529	18	76	0
4038399	57108	UGGAGGAUUUCAUCUCUUG	2118	18	76	0
4038400	57108	GCAAUAGGUGUGCGUCAGA	1526	14	76	0
4038401	57108	GGAAGACUCCAGUGGUAU	1022	17	76	0
4038402	57108	CAAUAGGUGUGCGUCAGAA	1527	15	76	0
4038403	57108	GACUGGGUCUCGCUUUGUU	2226	18	75	0
4038404	57108	UUGGGCAGCUGGUUAGGUA	2000	15	75	0
4038405	57108	UCAAGGCCCAUAUCUGUGA	1810	16	75	0
4038406	57108	GUUUUGGAUGACAGAAAC	863	16	75	0
4038407	57108	AGACUCCAGUGGUAUCUA	1025	16	74	0
4038408	57108	GUGCAGCUGUGGGUUGAUU	678	16	74	0
4038409	57108	AGCAAUGGAUGAUUUGAUG	365	16	74	0
4038410	57108	CCAGCCACCUGAAGUCCAA	1348	17	74	0
4038411	57108	GCUUUGAGGUGCGUGUUUG	1057	16	74	0
4038412	57108	CCACUACAACUACAUUGUGU	947	15	74	0
4038413	57108	GUGGCGUGAUCUUGGCUUA	2262	18	73	0
4038414	57108	CCCACACCCUGGAGGAUUU	2109	17	73	0
4038415	57108	UUUGGGAGAUGUAAGAAAU	1681	16	73	0
4038416	57108	GUGACACGCUUCCUGGAU	202	16	73	0
4038417	57108	GACAGAAGGGCCUGACUCA	1409	16	73	0
4038418	57108	GCGCACAGAGGAAGAGAAU	1097	16	73	0
4038419	57108	CGUGAGCGCUUCGAGAUGU	1254	15	72	0

ES 2 440 284 T3

ID	ID de la Mezcla de ARNip	Codificante	Pos. Inicial	Puntuación del Blast	Puntuación Ajust.	Selección de la mezcla
4038420	57108	GAGCCGCAGUCAGAUCUA	258	17	72	0
4038421	57108	UGACACGCUUCCUGGAUU	203	15	72	0
4038422	57108	GAAACUACUCCUGAAAAC	320	17	72	0
4038423	57108	ACAAUCAGCCACAUUCUAG	1724	16	72	0
4038424	57108	GCACUGGUGUUUUGUUGUG	1600	17	72	0
4038425	57108	GAAACCACUGGAUGGAGAA	1211	17	72	0
4038426	57108	UGGAGGAGCCGCAGUCAGA	253	17	72	0
4038427	57108	AGAGGGAGUUGUCAAGUCU	2018	17	72	0
4038428	57108	CUUCAAGGCCAUUUCUGU	1808	16	72	0
4038429	57108	CAGAUGAAGCUCCAGAAU	430	17	72	0
4038430	57108	UAGAGGGAGUUGUCAAGUC	2017	16	71	0
4038431	57108	UCAGACCUAUGGAAACUAC	309	15	71	0
4038432	57108	CGCCUGAGGUUGGCUCUGA	916	16	71	0
4038433	57108	GAAUGAGGCCUUGGAACUC	1283	17	70	0
4038434	57108	GUCAACUUCUUUACAUUC	2509	17	70	0
4038435	57108	GAAGGUCAACAUCUUUUA	2504	17	70	0
4038436	57108	ACAGUUGGGCAGCUGGUUA	1996	15	70	0
4038437	57108	CAAGGCCCAUAUCUGUGAA	1811	16	70	0
4038438	57108	UGAAUGAGGCCUUGGAACU	1282	17	70	0
4038439	57108	GCUGGGAUUACAAUUGUGA	2468	18	70	0
4038440	57108	CCAAGCAAUGGAUGAUUUG	362	16	70	0
4038441	57108	GUGUGGUGGUGCCCUAUGA	895	16	70	0
4038442	57108	CAACUUCUUUACAUUCUG	2511	17	69	0
4038443	57108	CUGGAAGGGUCAACAUCUU	2501	16	69	0
4038444	57108	AAAUUUGCGUGUGGAGUUA	848	15	69	0
4038445	57108	CCAGAUGAAGCUCCAGAA	429	16	68	0
4038446	57108	UGUAUAUGAUGAUCUGGAU	2135	17	68	0
4038447	57108	CCUGGAGGAUUUCAUCUCU	2116	17	68	0
4038448	57108	UACAAUCAGCCACAUUCUA	1723	16	68	0
4038449	57108	AAGGGUUAGUUUACAAUCA	1712	15	68	0
4038450	57108	UGAGGGAUGUUUGGAGAU	1672	17	68	0
4038451	57108	GAGUAGGACAUACCAGCUU	1633	18	68	0
4038452	57108	UGACAUUCUCCACUUCUUG	1431	17	68	0
4038453	57108	CCACCAUCCACUACAACUA	940	17	68	0

ID	ID de la Mezcla de ARNip	Codificante	Pos. Inicial	Puntuación del Blast	Puntuación Ajust.	Selección de la mezcla
4038454	57108	CCAUGGCCAUCUACAAGCA	727	17	68	0
4038455	57108	AAGCACAUUCUGCAUUUUCA	2531	18	68	0
4038456	57108	UGGAAGGGUCAACAUCUUU	2502	17	68	0
4038457	57108	GGAAGCUGUCCUCAUGUU	1776	17	68	0
4038458	57108	CAUGGCGACUGUCCAGCUU	7	16	68	0
4038459	57108	UGGAGAUGUAAGAAAUGU	1683	17	68	0
4038460	57108	GACAUUCUCCACUUCUUGU	1432	17	68	0
4038461	57108	ACCACUGGAUGGAGAAUUAU	1214	16	68	0
4038462	57108	AGGAUUUCAUCUCUUGUAU	2121	16	68	0
4038463	57108	GAGUGCAUUGUGAGGGUUA	1856	16	68	0

Extracto de la Tabla XIV (Tabla 14.txt)

ID	ID del Gen	Acceso
57108	61047	NM_000546

5 **Extracto de la Tabla XV (Tabla 15.txt)**

ID	Nombre	Descripción	ID del Organismo	Nombres Alt.	Clave CTG	ID del Locus
61047	TP53	Proteína tumoral p53 de Homo sapiens (síndrome de Li-Fraumeni) (TP53), ARNm.	1	P53, p53, TRP53	0	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ARNip que comprende una región bicatenaria que consiste de una cadena codificante y una cadena no codificante, en donde dicha cadena codificante comprende la secuencia GAGAAUAAUUUCACCCUUA (sec. con núm. de ident. 512,246).
- 10 2. La molécula de ARNip de la reivindicación 1, en donde dicha molécula de ARNip consiste de:
 (a) dicha región bicatenaria; y
 (b) las bases no colgantes o las bases colgantes que contienen uno a seis nucleótidos en el extremo 5' o 3' de la cadena codificante y/o de la cadena no codificante.
- 15 3. La molécula de ARNip de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha región bicatenaria es de 19-30 pares de base de longitud.
- 20 4. La molécula de ARNip de la reivindicación 3, en donde dicha región bicatenaria es de 19-25 pares de base de longitud.
- 25 5. La molécula de ARNip de la reivindicación 4, en donde dicha región bicatenaria es de 19 pares de bases de longitud.
- 30 6. La molécula de ARNip de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha molécula de ARNip tiene bases colgantes.
- 35 7. La molécula de ARNip de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha molécula de ARNip no tiene bases colgantes.
8. Una molécula de ARNip como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para usar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal.
9. Un método para silenciar tp53 que comprende usar la molécula de ARNip como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho método no es un método de tratamiento del cuerpo humano o animal por cirugía o terapia o un método diagnóstico practicado sobre el cuerpo humano o animal.
10. Una mezcla de al menos dos moléculas de ARNip, en donde la primera molécula de ARNip es una molécula de ARNip como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y cada molécula de ARNip adicional es efectiva en el silenciamiento de tp53.

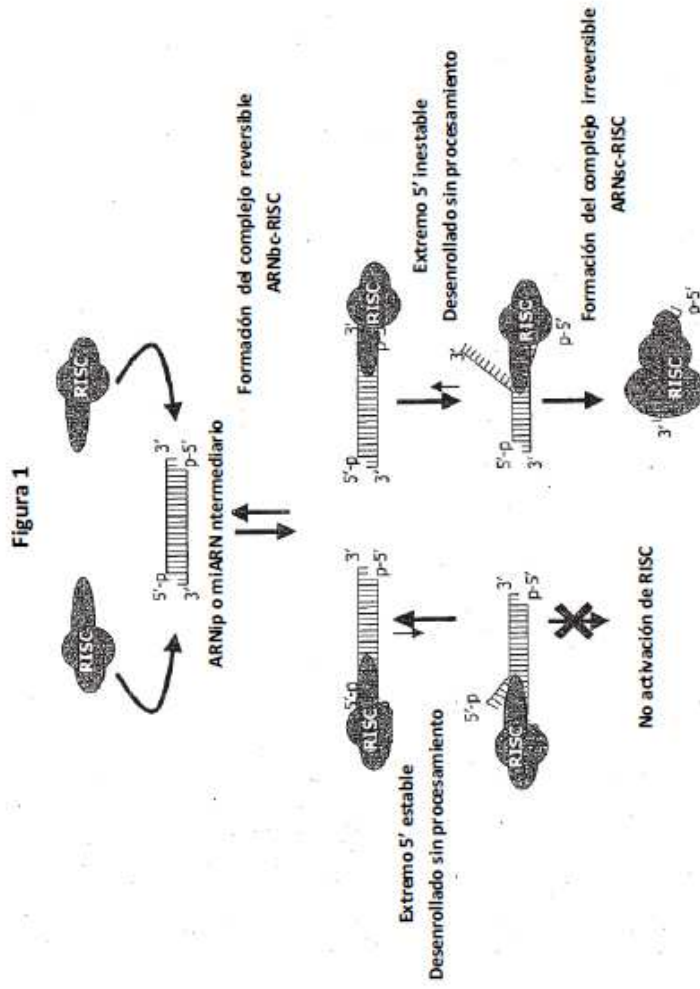


Figura 2

Panel de ARNip (270)

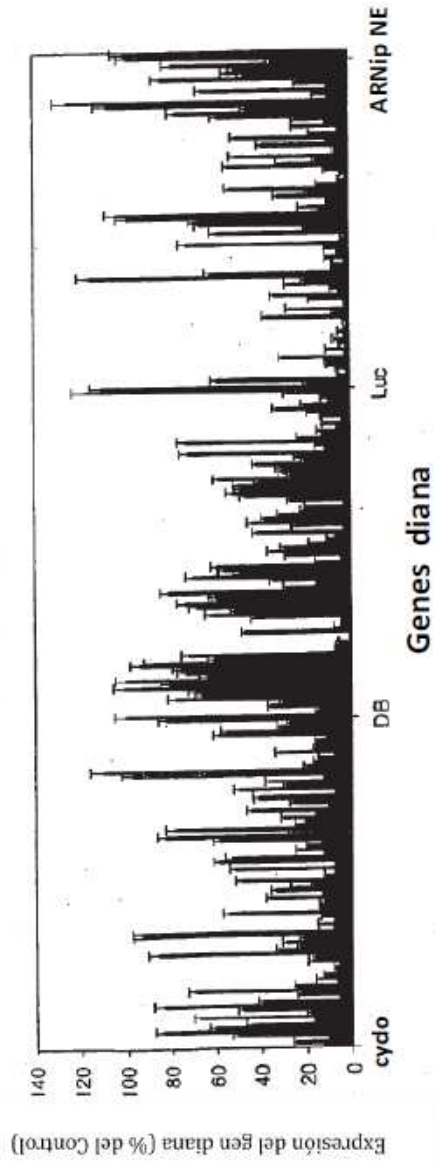
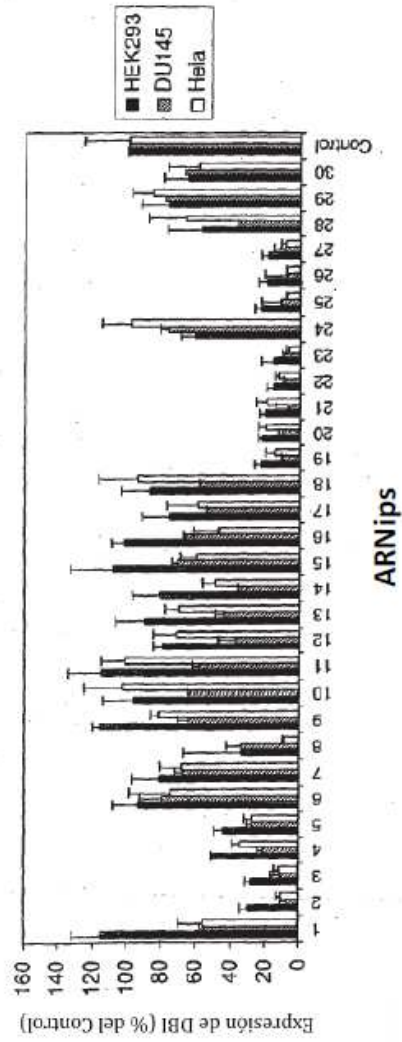


Figura 3A

La funcionalidad del ARNip es independiente de la línea celular



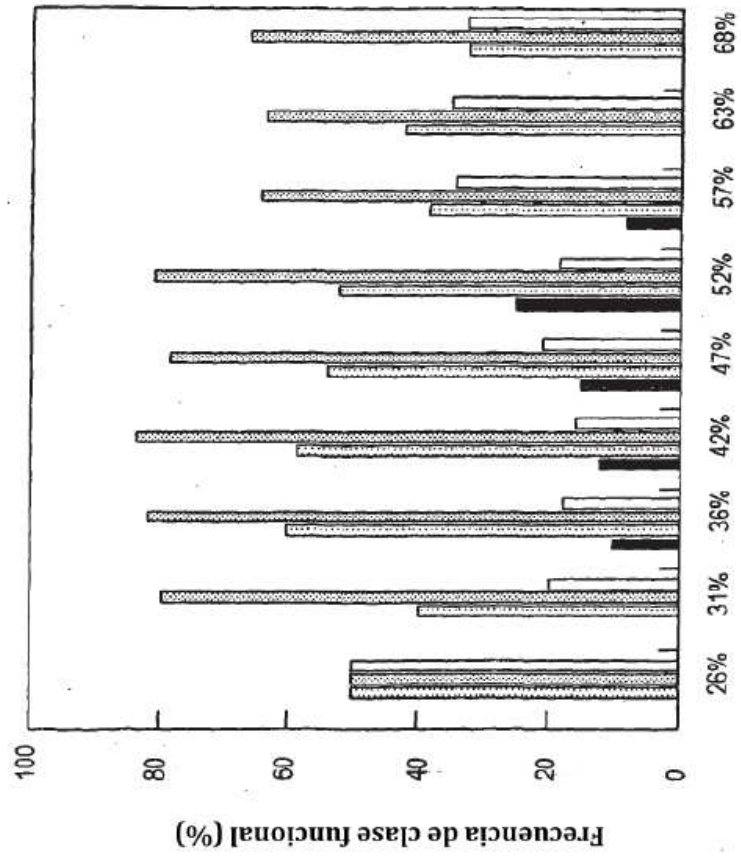


FIG. 3B

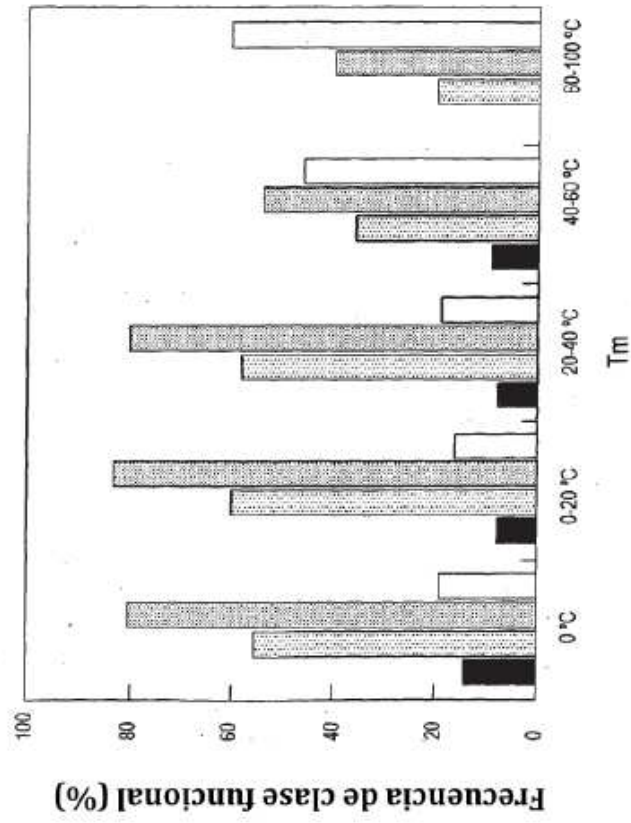


Figura 4A

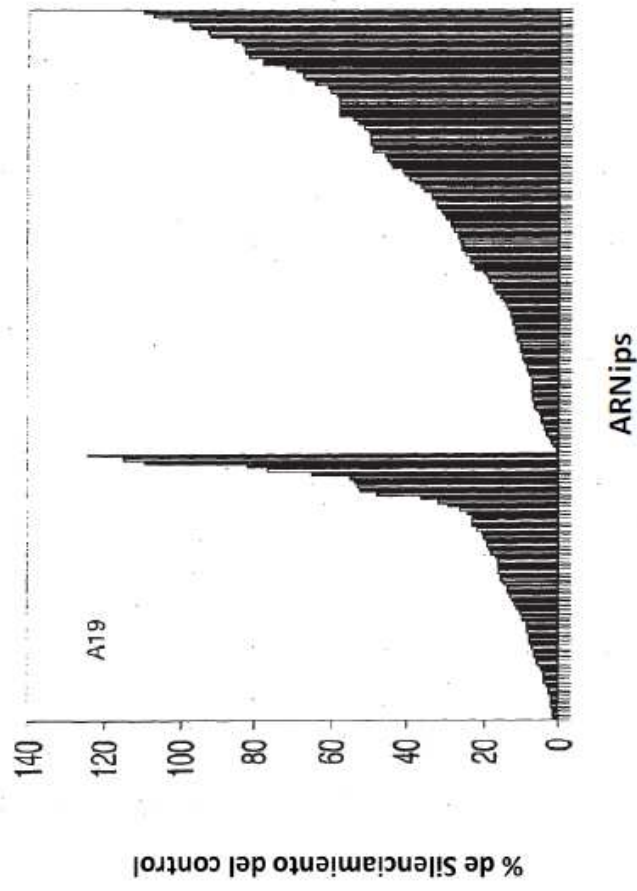


Figura 4B

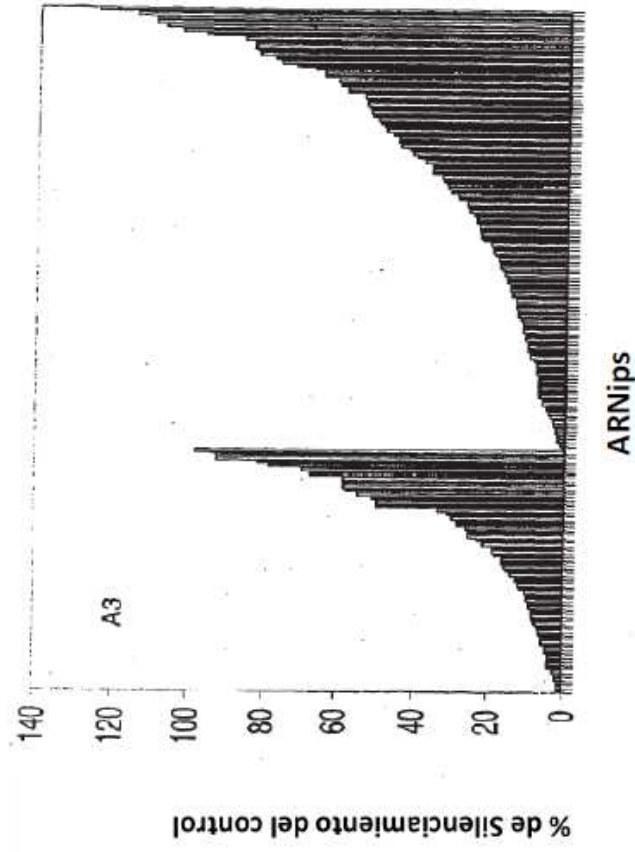


Figura 4C

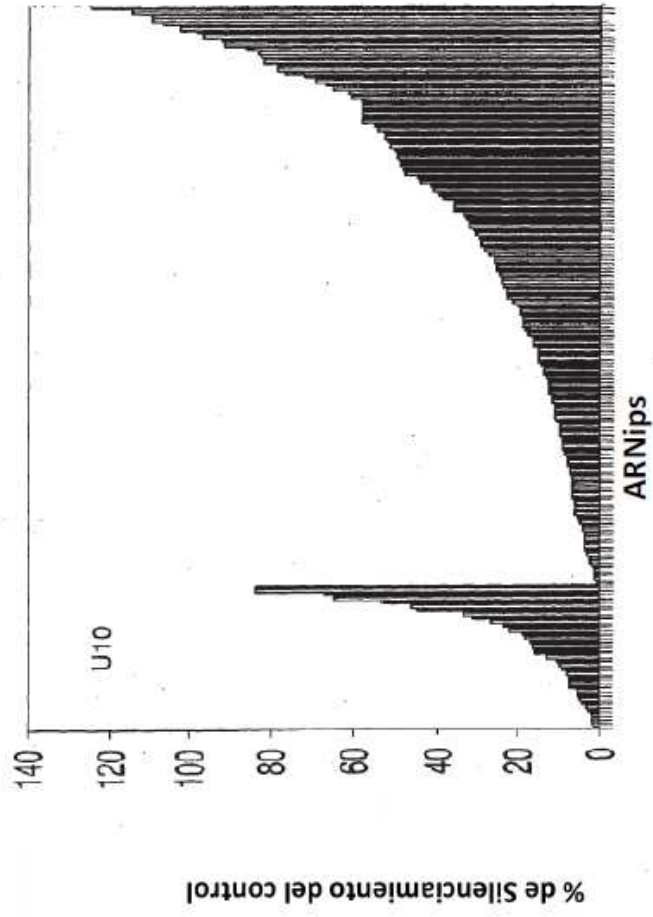


Figura 4D

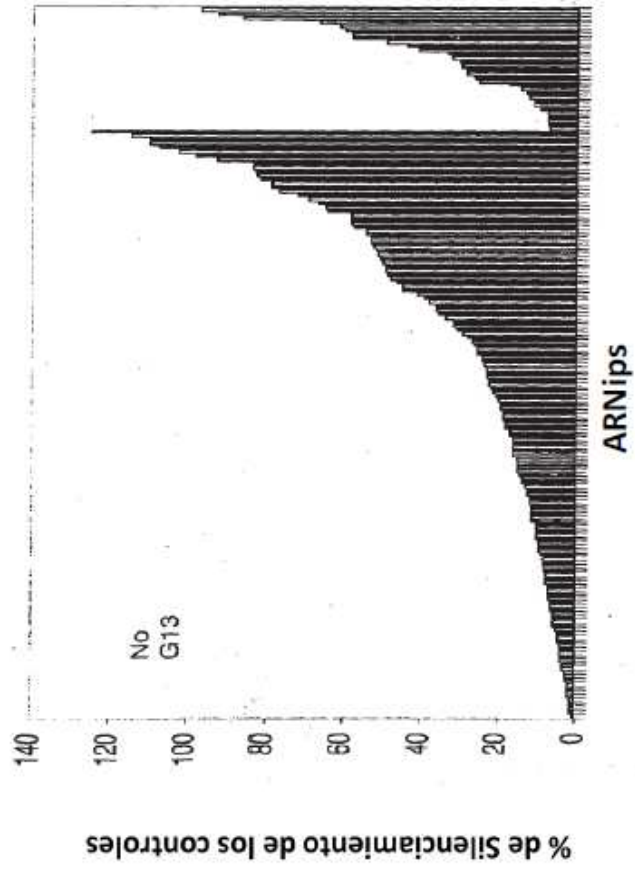


Figura 4E

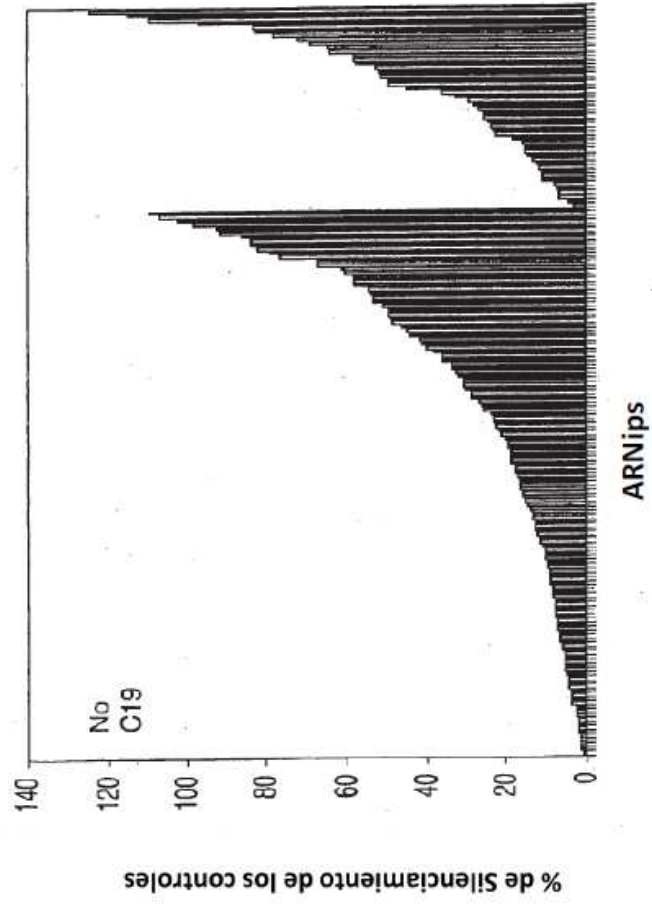


Figura 5A

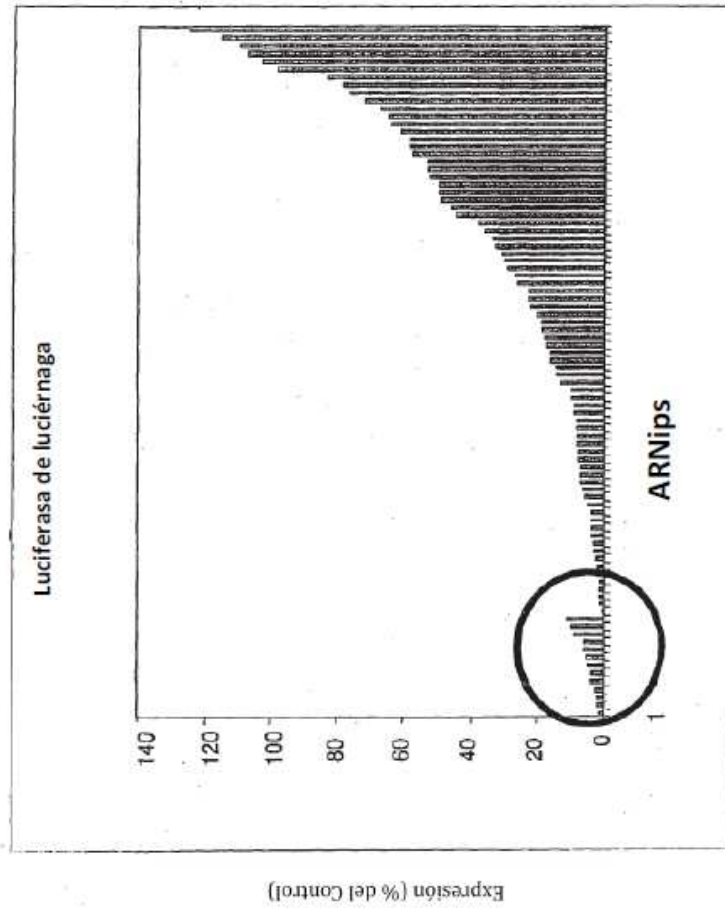


Figura 5B

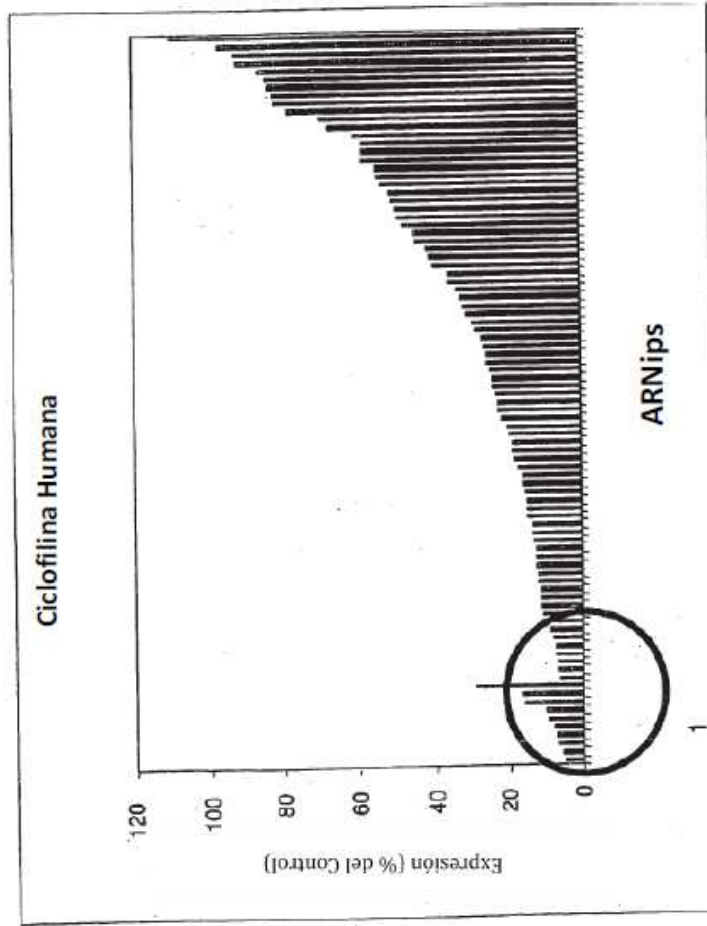


Figura 6A

Estabilidad diferencial interna

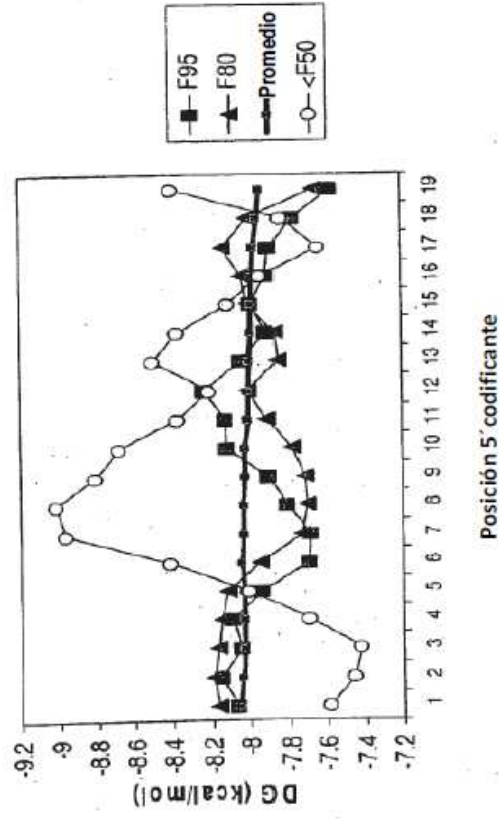
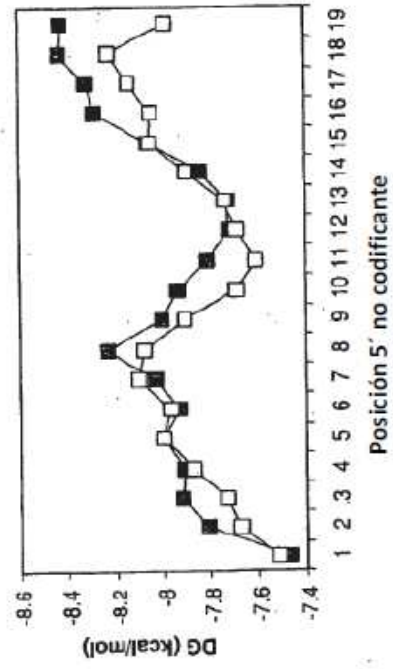


Figura 6B



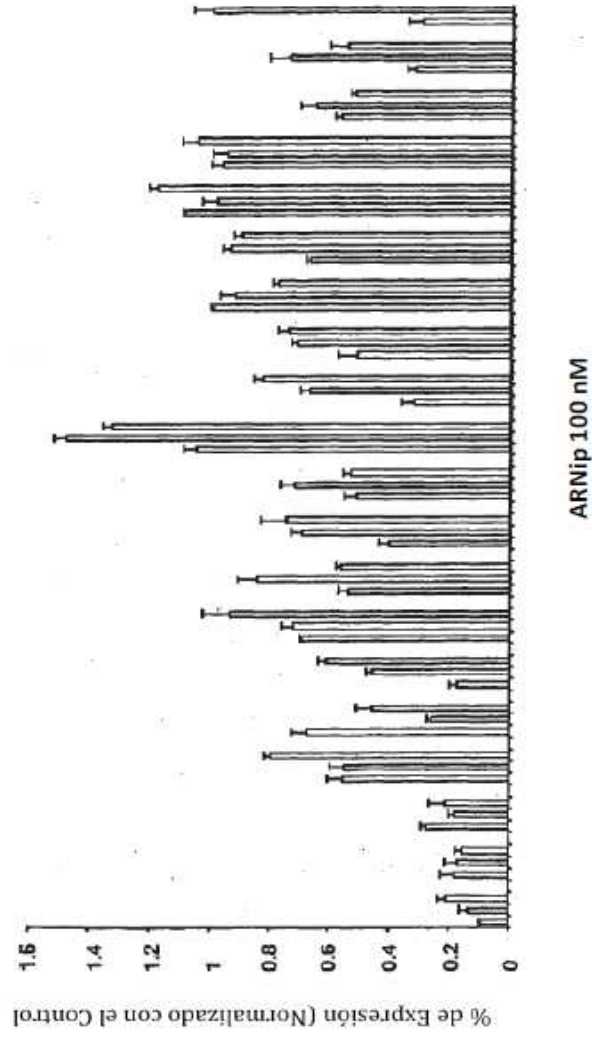
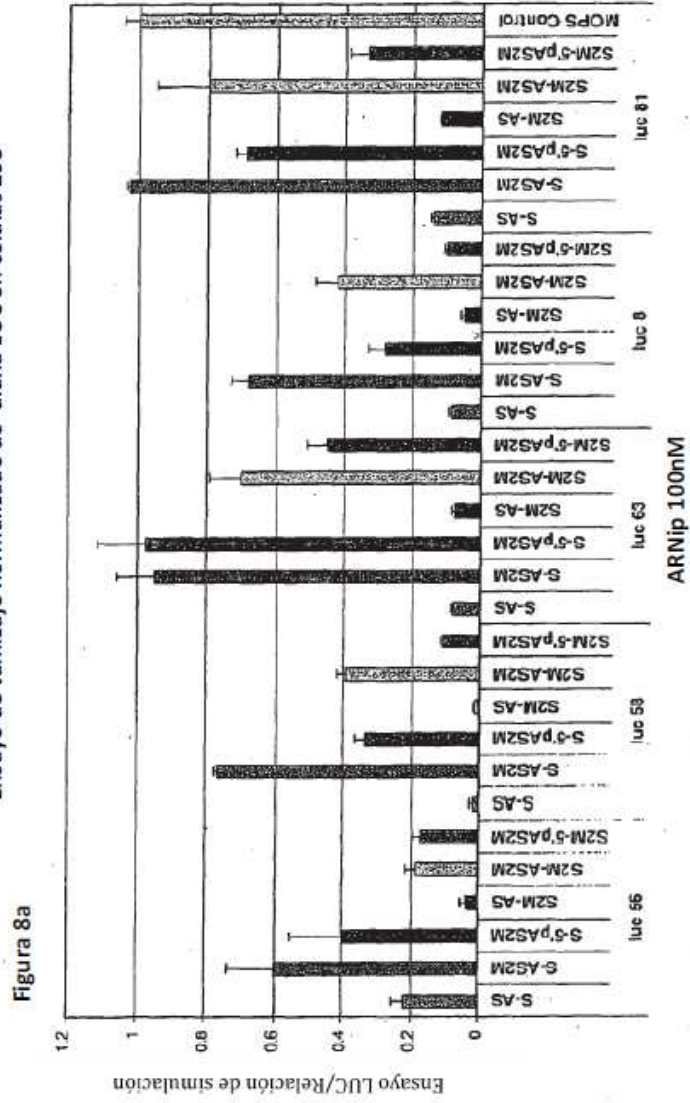
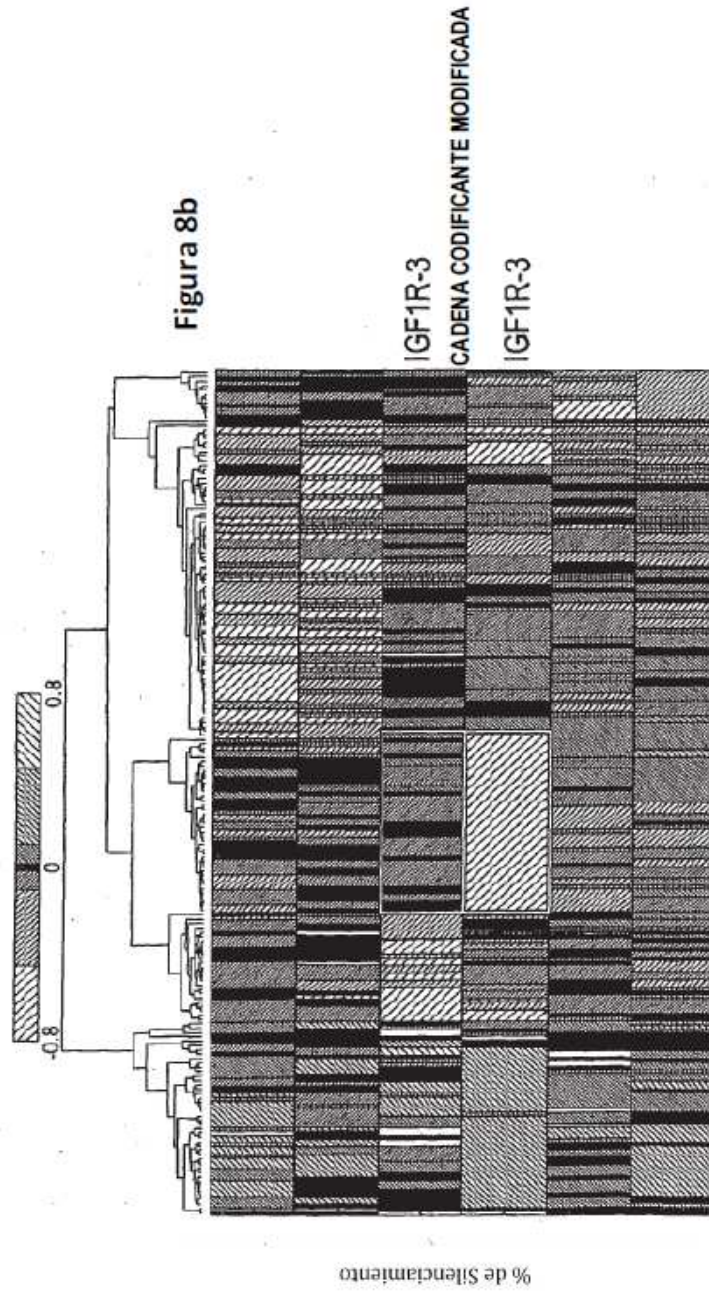


FIGURA 7

Ensayo de tamizaje normalizado de diana LUC en células 293





RESUMEN DEL ANALISIS DE AGRUPACION:
14 DE AGOSTO DE 2003 13:54:57 EG DE VFLER1BIO-PUBLICUSCHELTERRNAIDHARWACOM.2003-JULY.IGF1R-CHEM-MOD1.MAT
PARAMETROS DE AGRUPAMIENTO: ALGORITMO=AHC TIPO=GEN, MEDIDA DE SIMILITUD=TPO METRICO BASADO EN CORRELACION=LINKAGECLUSTS, |LOG10
(RELACION) | >0.2 Y VALOR DE P<0.01 EN UNO O MAS EXPERIMENTOS Y CON UNO O MAS GENES
ESTADISTICAS: 193 GENES EN 6 EXPERIMENTOS SELECCIONADOS A PARTIR DE 23661 GENES EN 6 EXPERIMENTOS

Figura 9

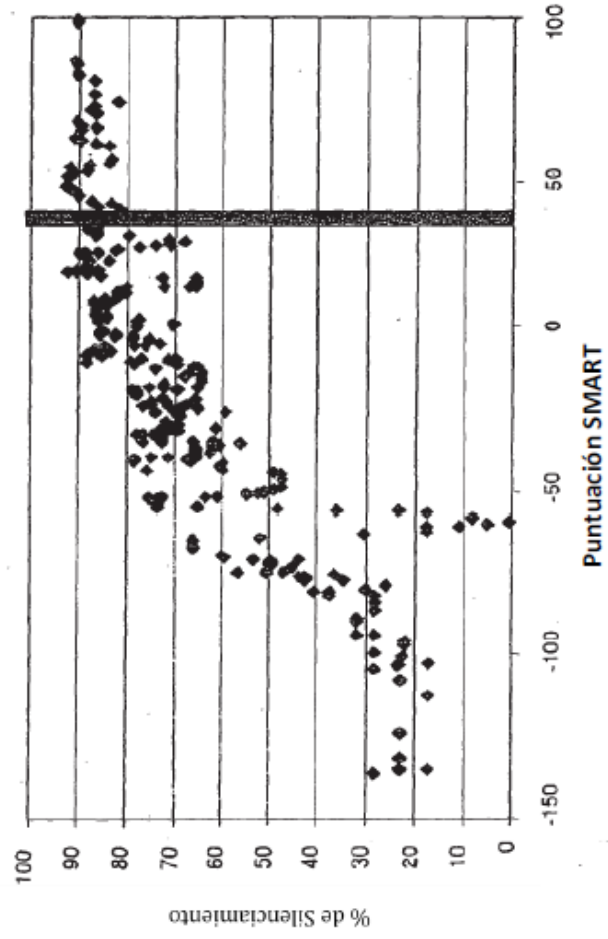


Figura 10A

Fosfatasa Alcalina Humana Secretada

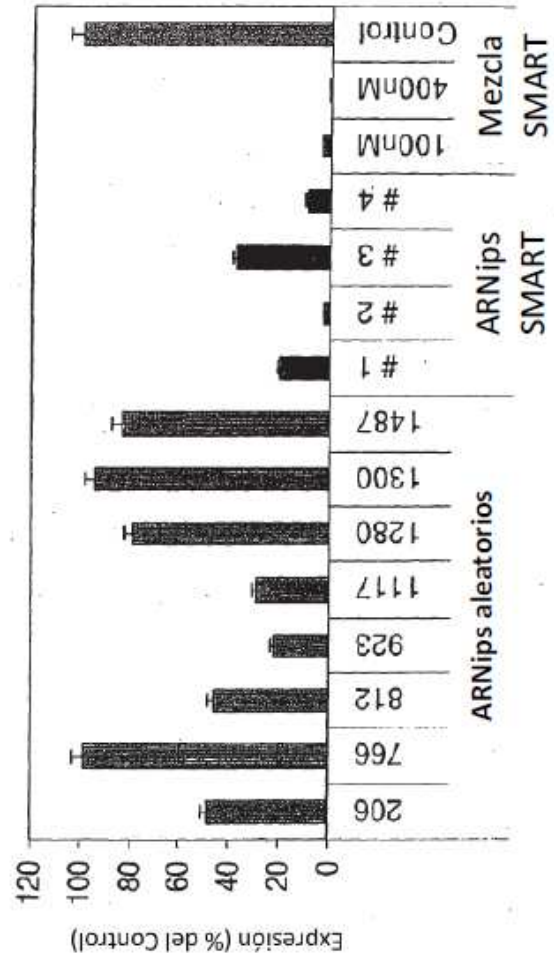


Figura 10B

Proteína de unión a la Acil-Coenzima a Humana
(DBI)

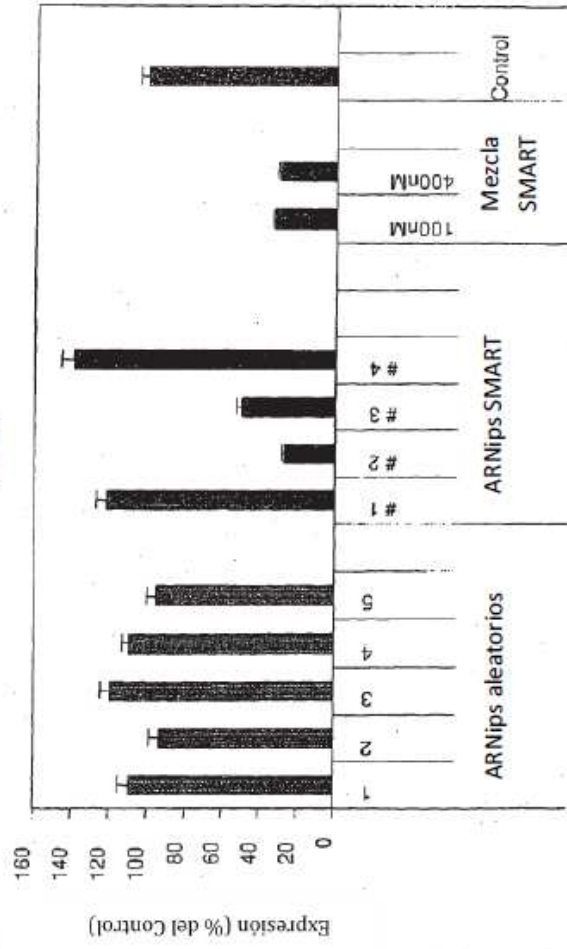


Figura 10C

Quinasa similar a polo humana (PLK)

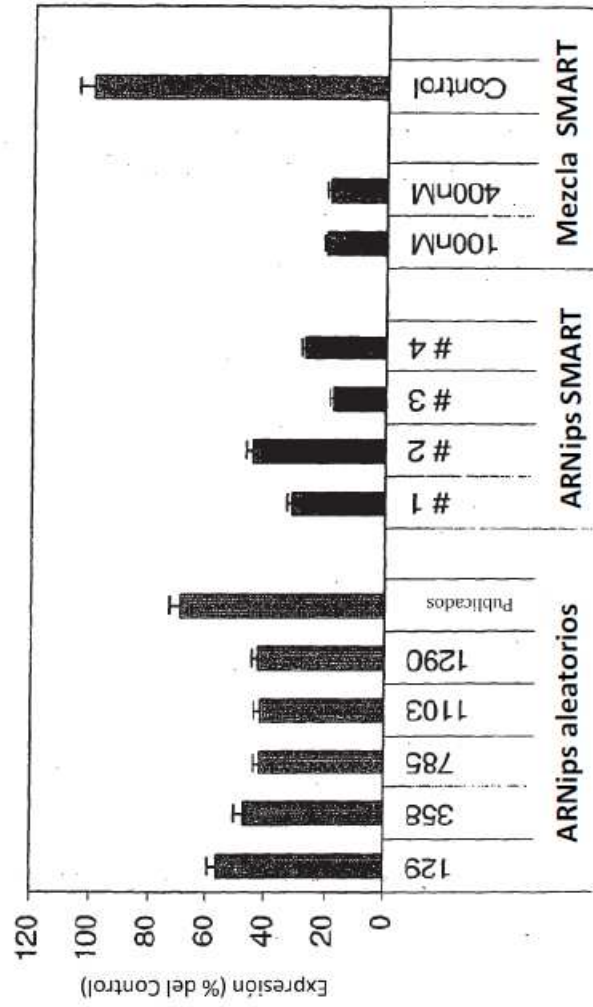


Figura 10D

Luciferasa de luciérnaga

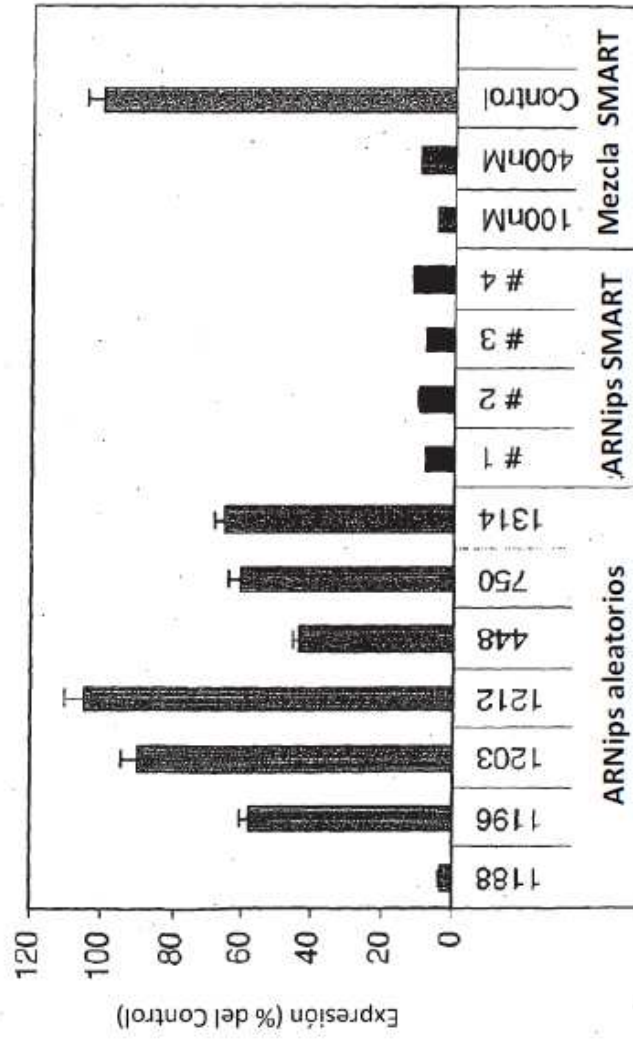


Figura 10E

Luciferasa de Renilla

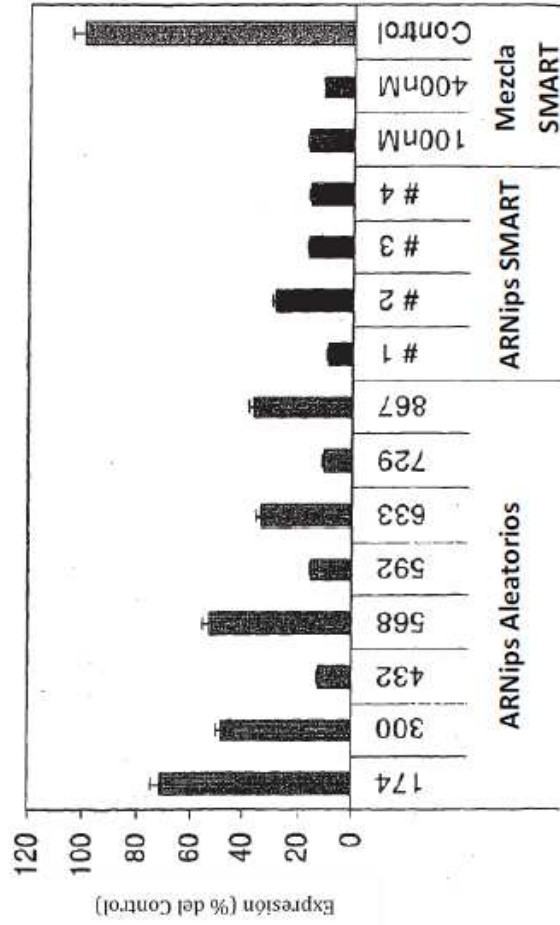
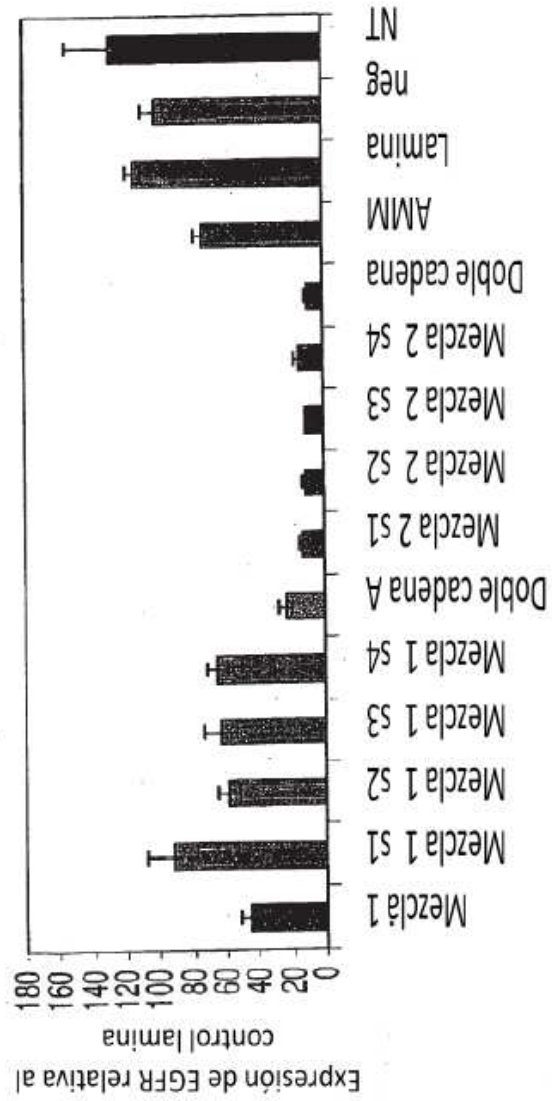


Figura 10F

EGFR



Doble cadena aplicada

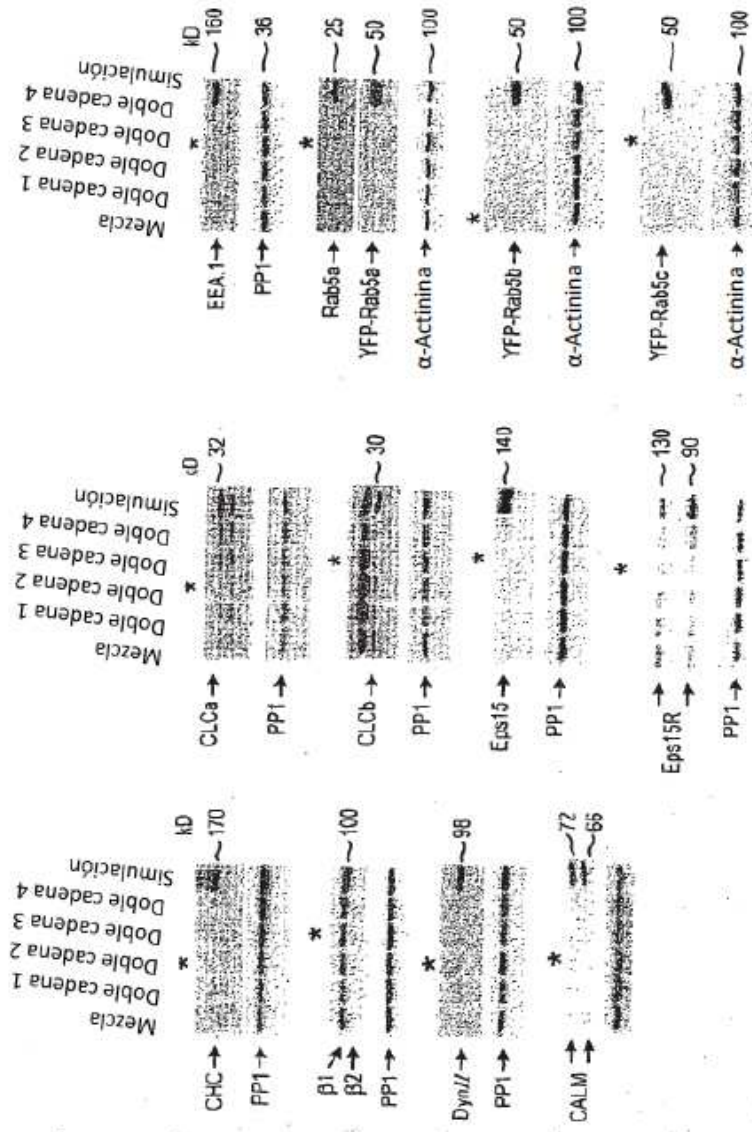


FIG. 11

Figura 12

Validación de la selección racional

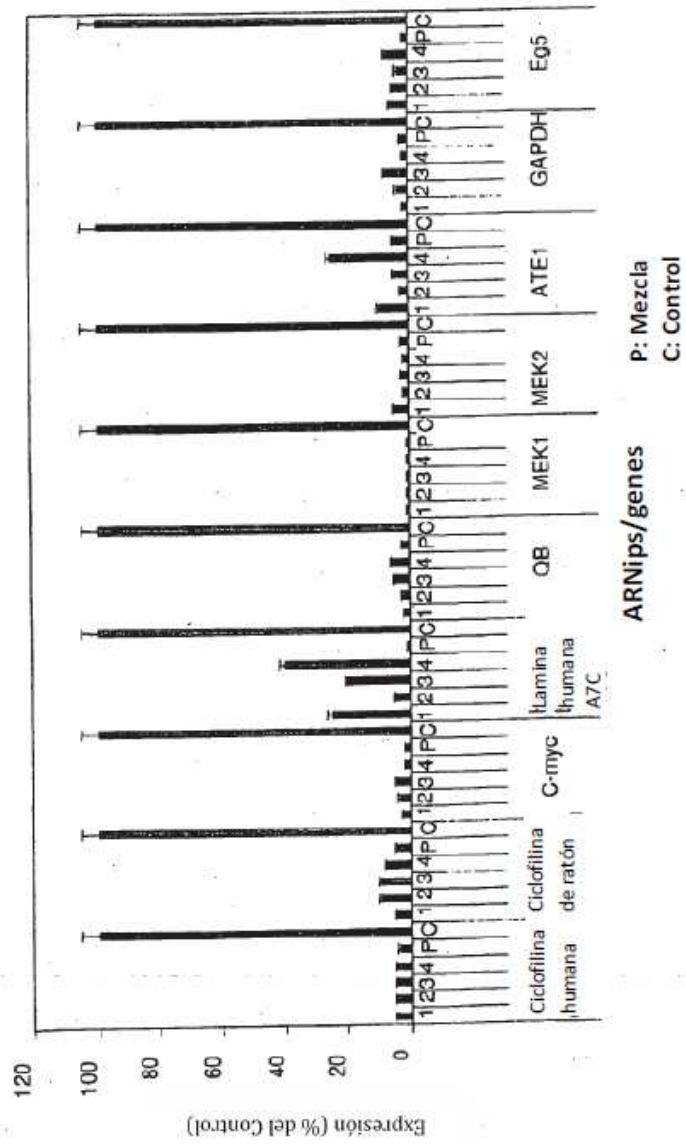
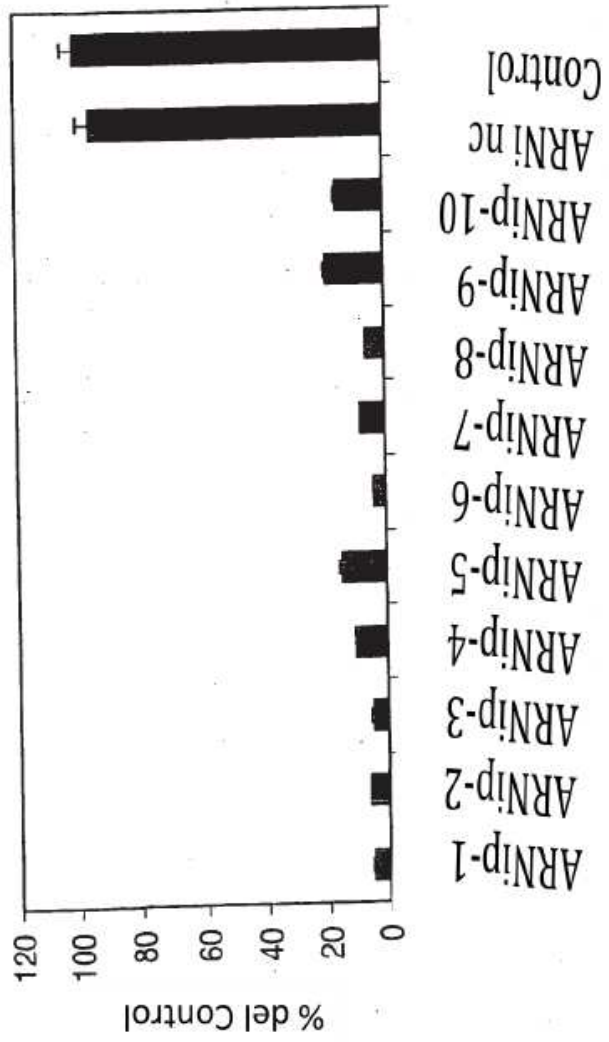


Figura 13 Secuencias de los 10 mejores ARNips para Bcl2

ARNip	1	GGGAGAUAGUGAUGAAAGUA	(SEC. ID	NO. 301)
ARNip	2	GAAGUACAUCCAUUAUAAAG	(SEC. ID	NO. 302)
ARNip	3	GUACGACAACCGGAGAU	(SEC. ID	NO. 303)
ARNip	4	AGAUAGUGAUGAAGUACAU	(SEC. ID	NO. 304)
ARNip	5	UGAAGACUCUGCUCAGUUU	(SEC. ID	NO. 305)
ARNip	6	GCAUGCGGCCUCUGUUUGA	(SEC. ID	NO. 306)
ARNip	7	UGCGCCUCUGUUUGAUUU	(SEC. ID	NO. 307)
ARNip	8	GAGAUAGUGAUGAAGUACA	(SEC. ID	NO. 308)
ARNip	9	GGAGAUAGUGAUGAAGUAC	(SEC. ID	NO. 309)
ARNip	10	GAAGACUCUGCUCAGUUUG	(SEC. ID	NO. 310)

Figura 14

Reducción de Bcl2 mediante 10 ARNips diseñados de manera racional a 100 nM de concentración



Pasos de ARNips individuales para genes reporteros

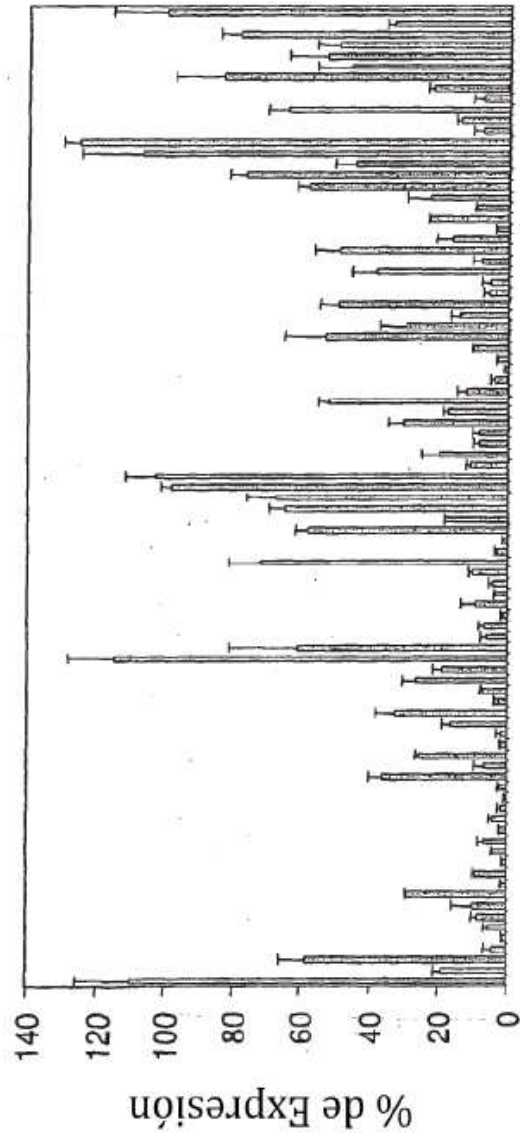


Figura 15

Figura 16A

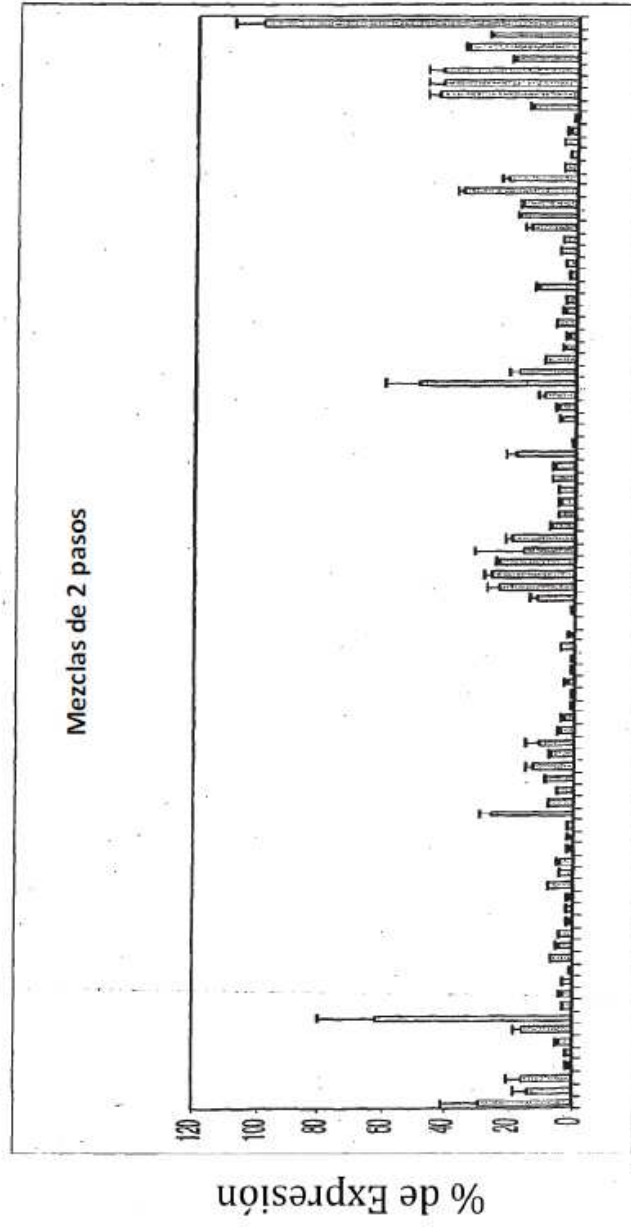


Figura 16B

Mezclas de 3 pasos

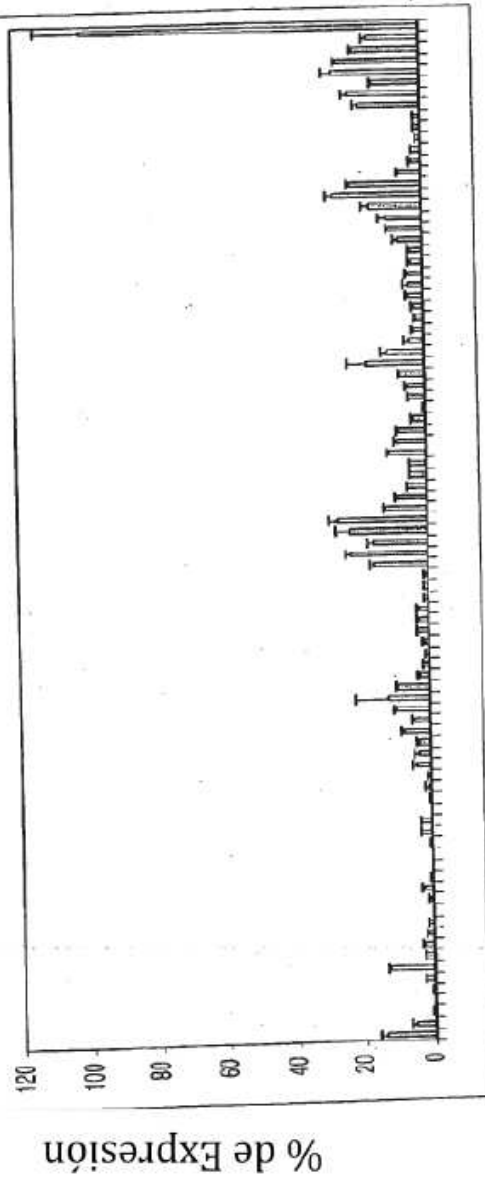


Figura 17A

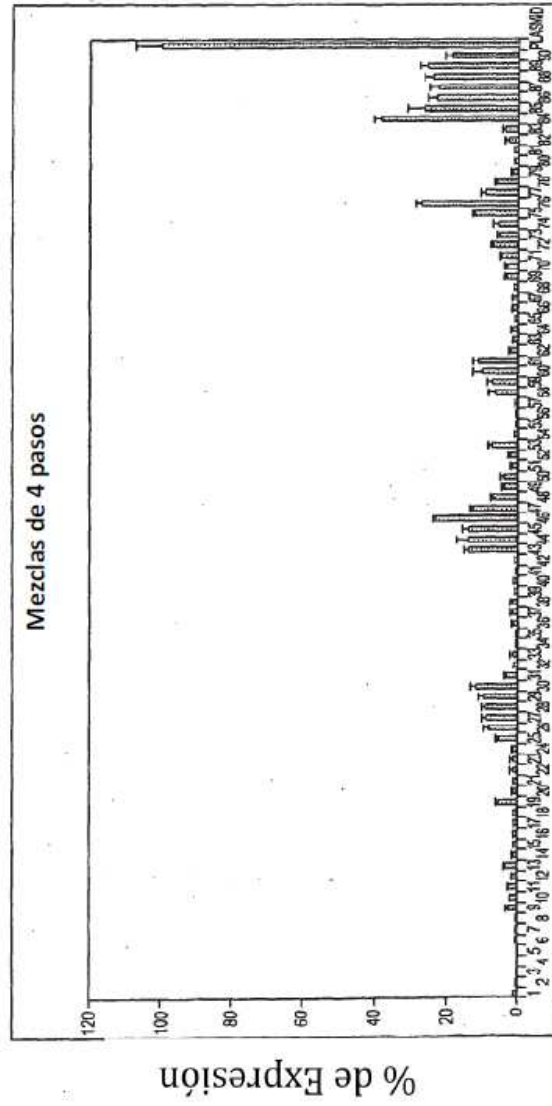


Figura 17B

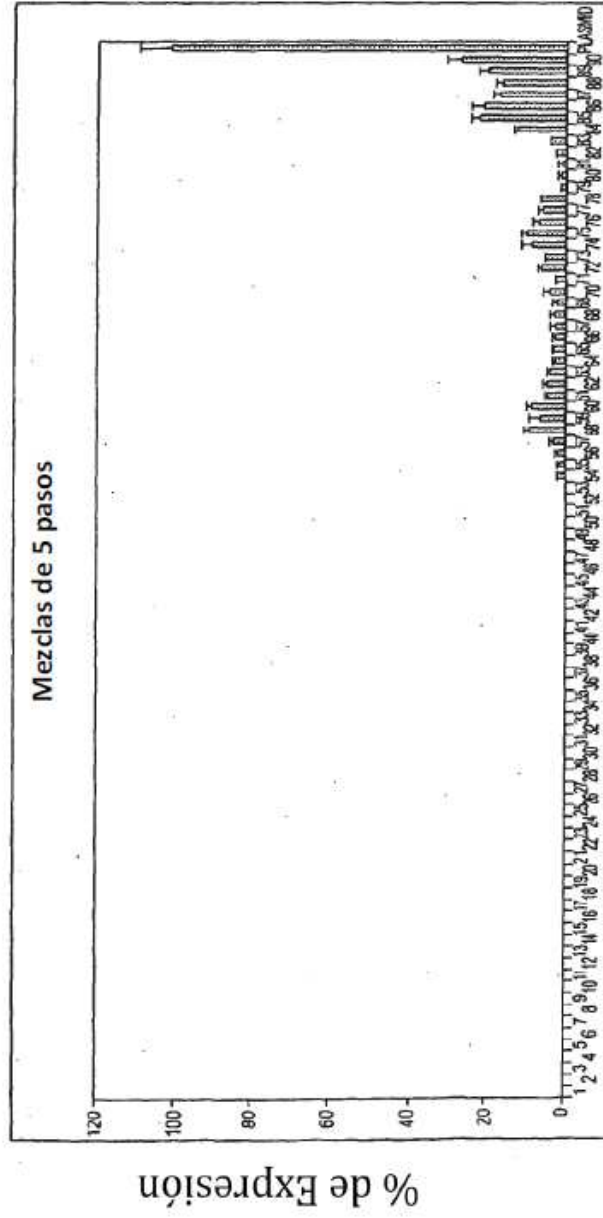


Figura 18A

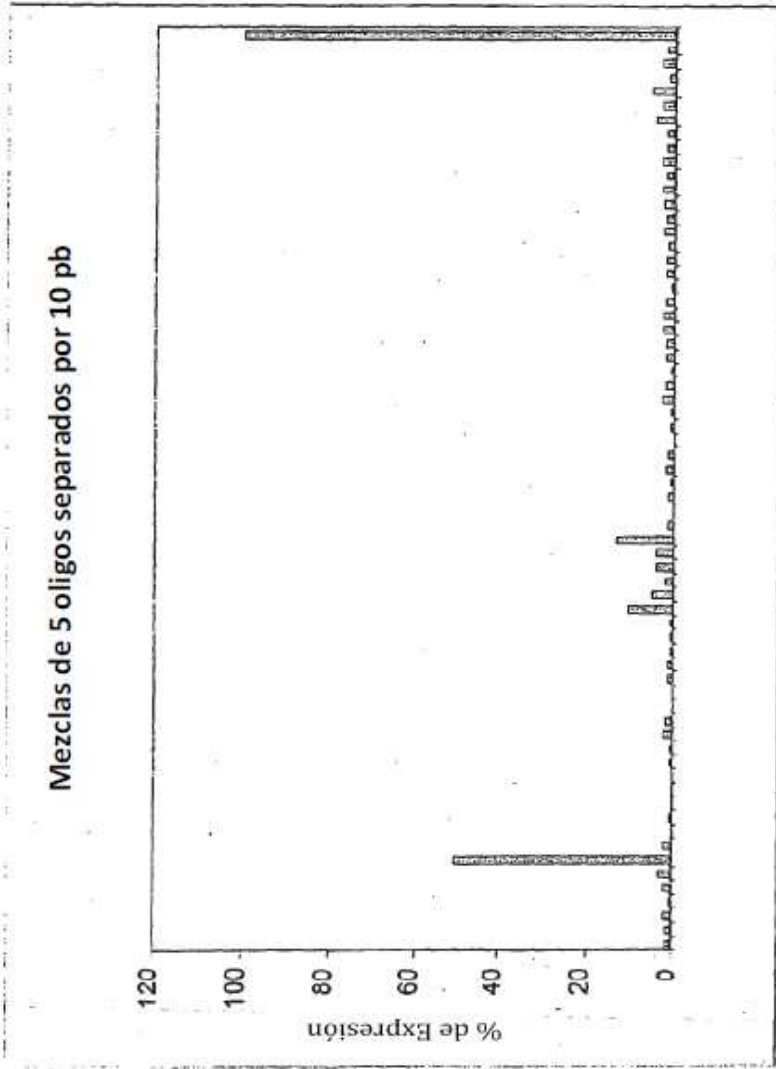
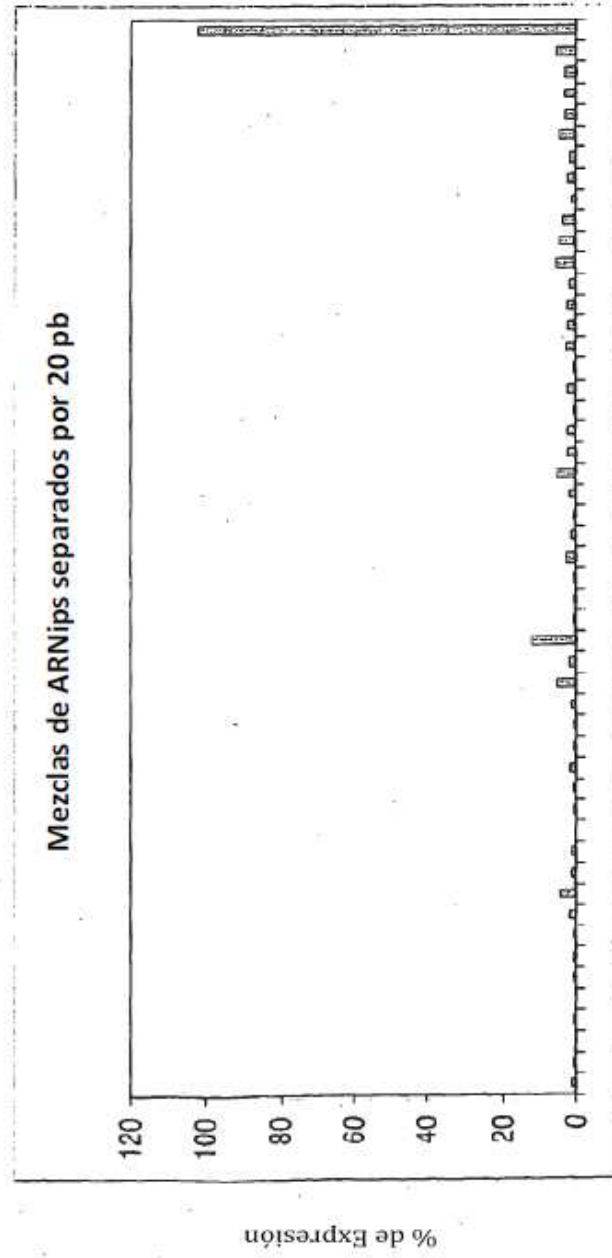


Figura 18B



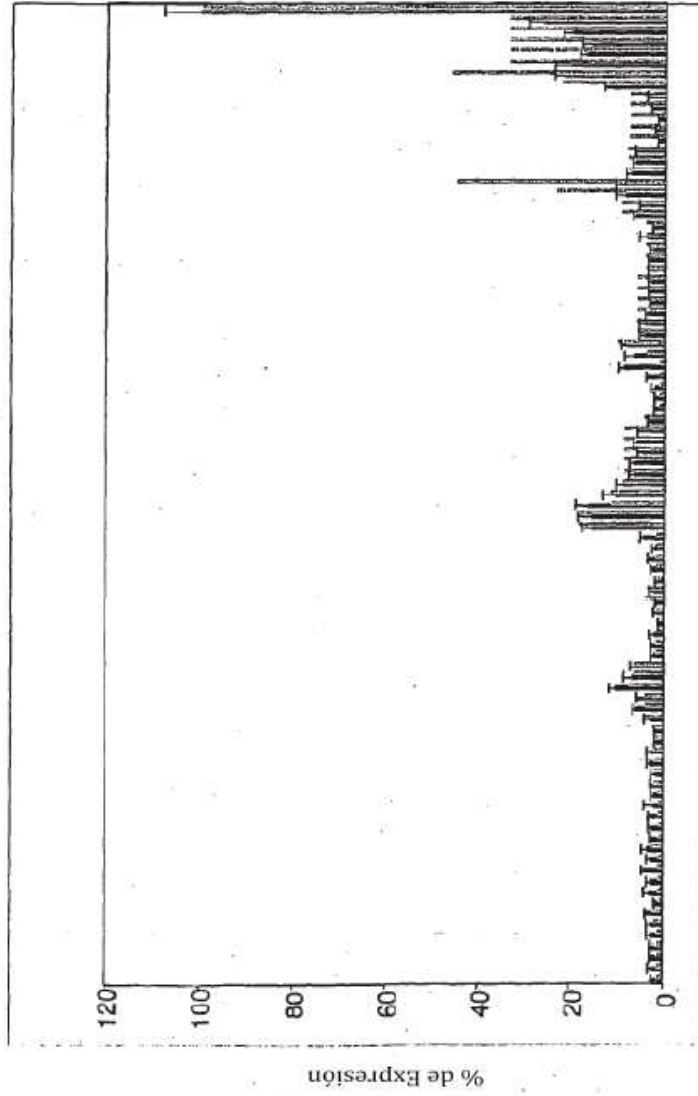


Figura 19

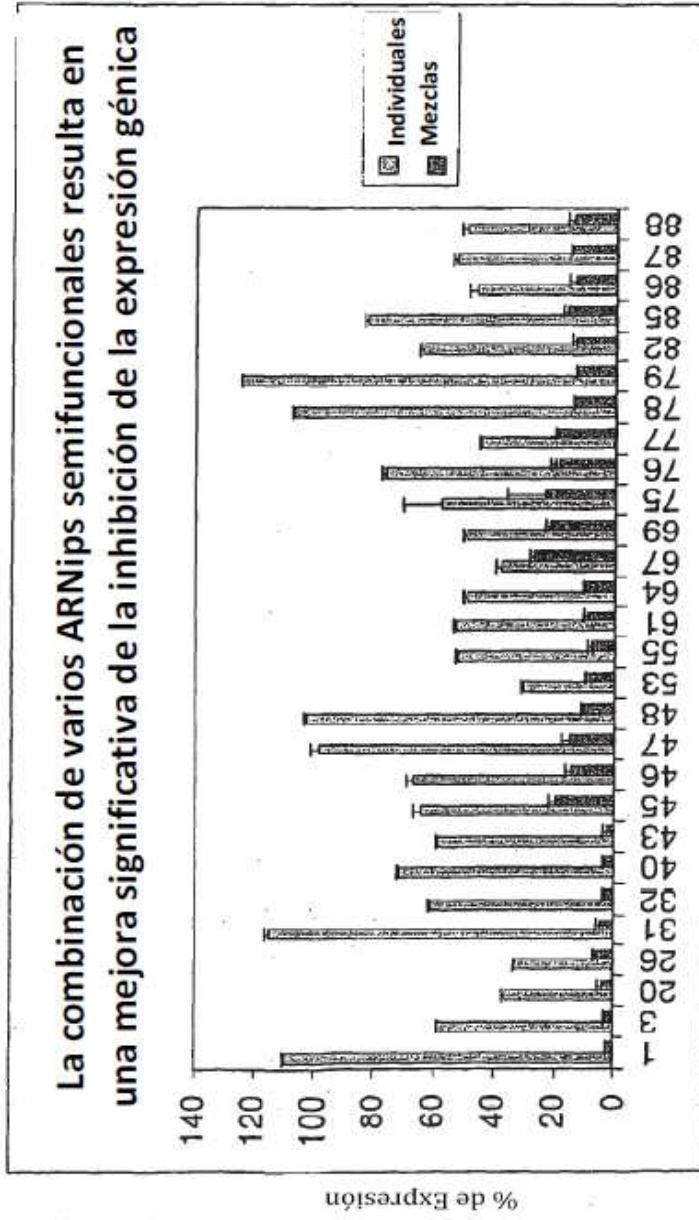


Figura 20

Figura 21A

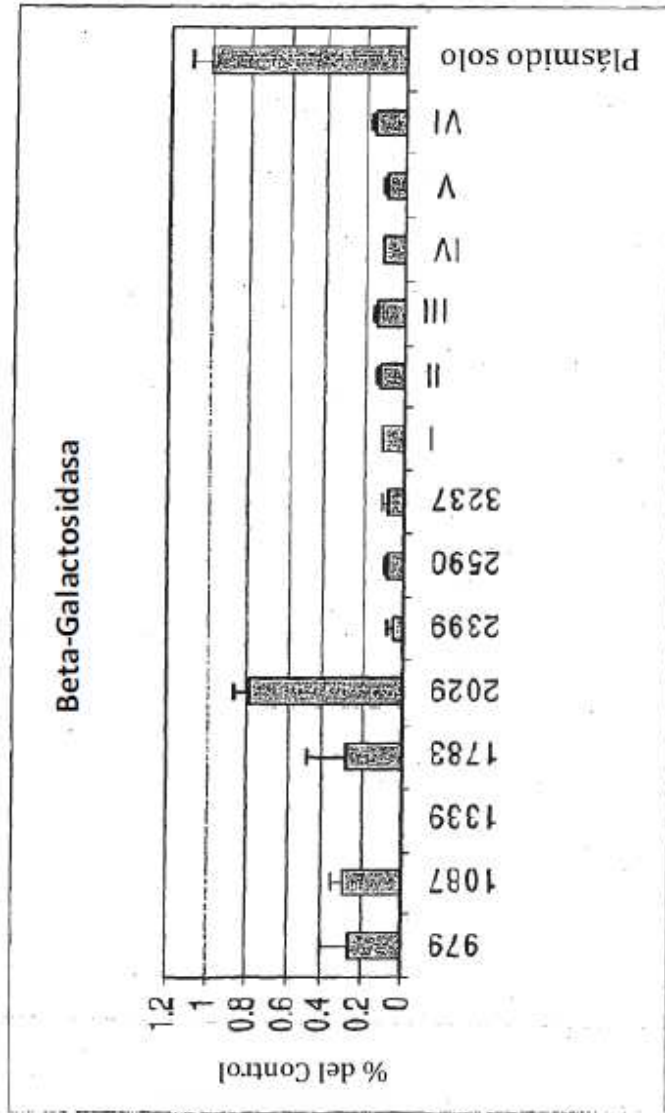


Figura 21B

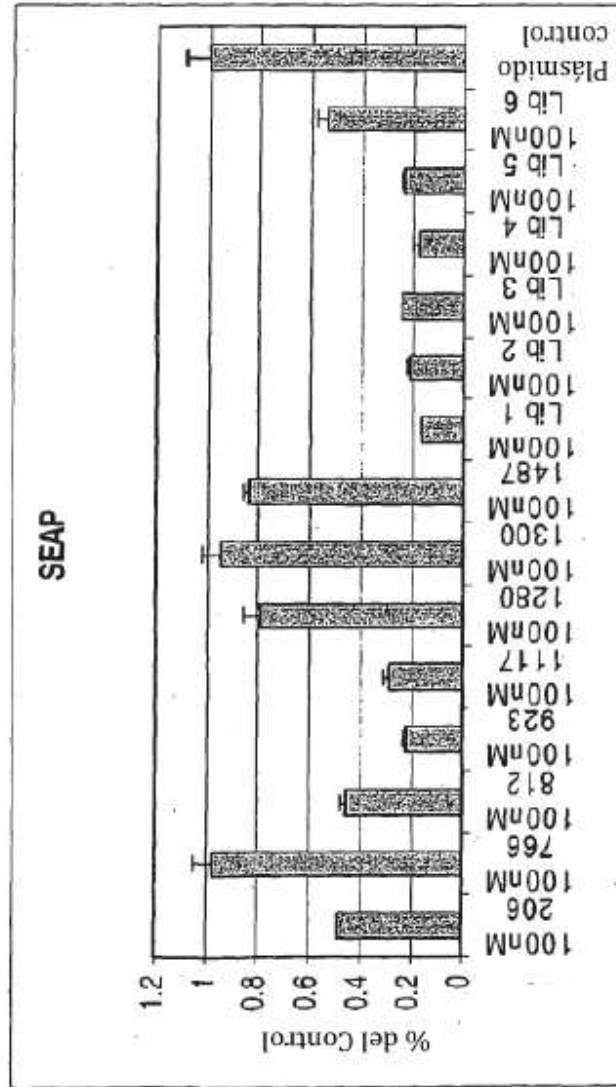
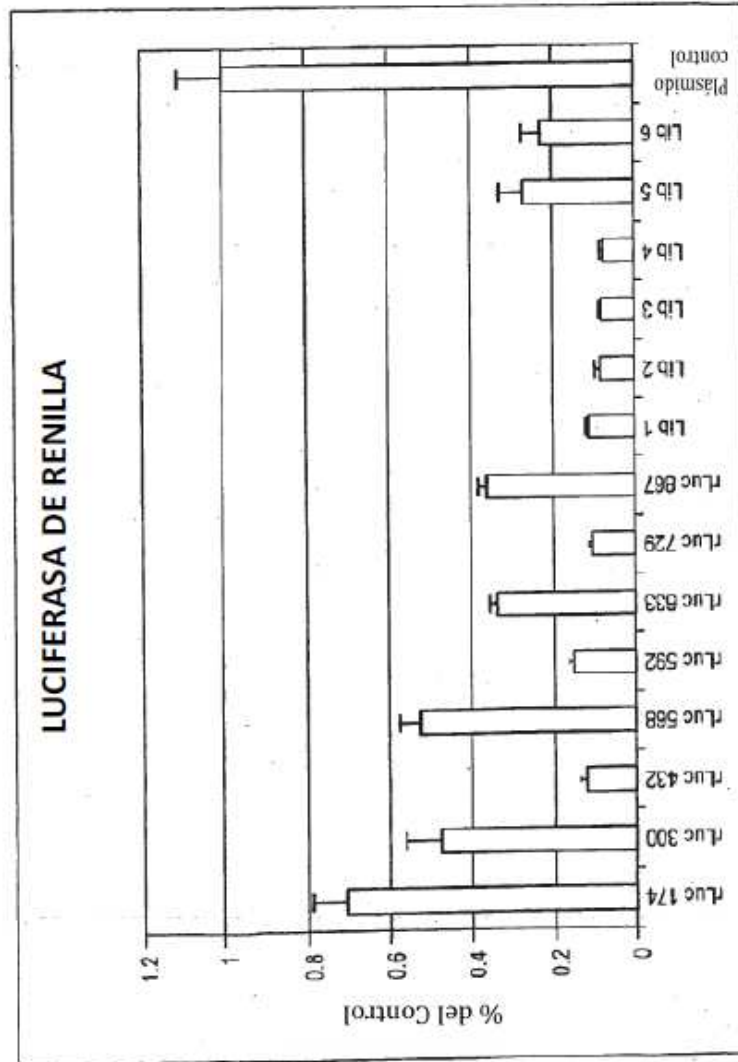


Figura 21C



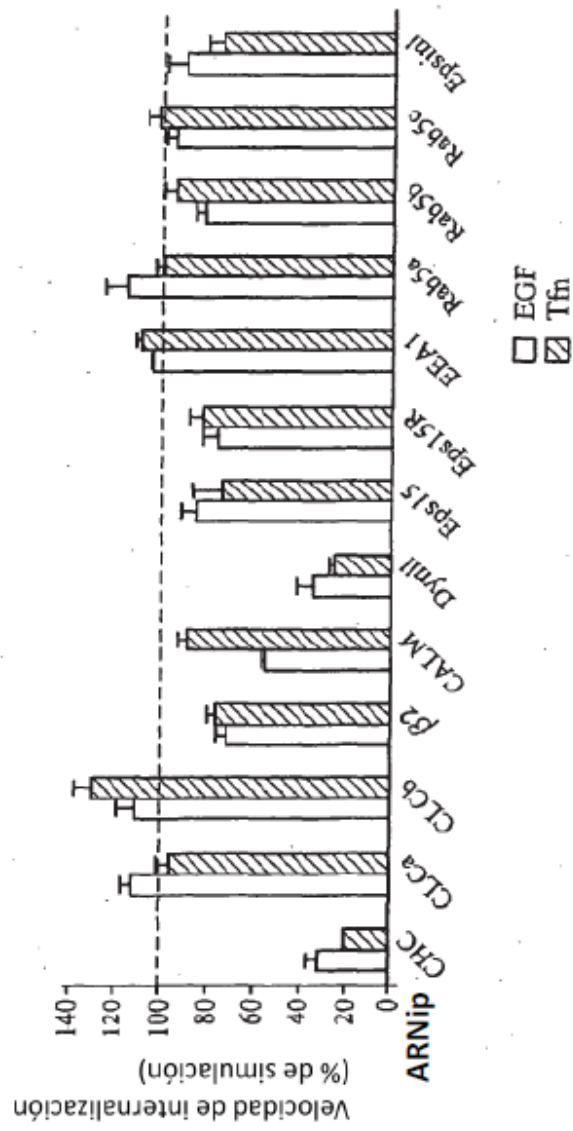


FIG. 22

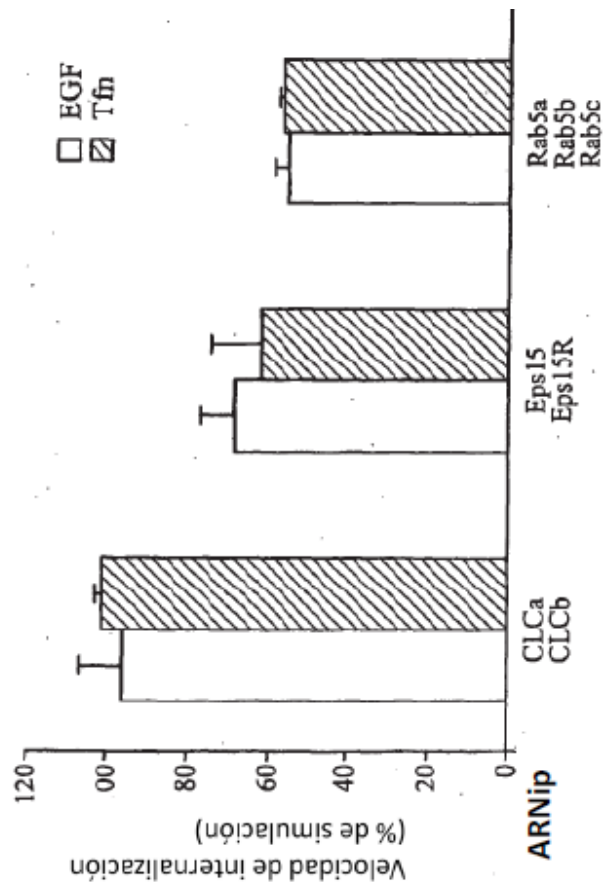


FIG. 23

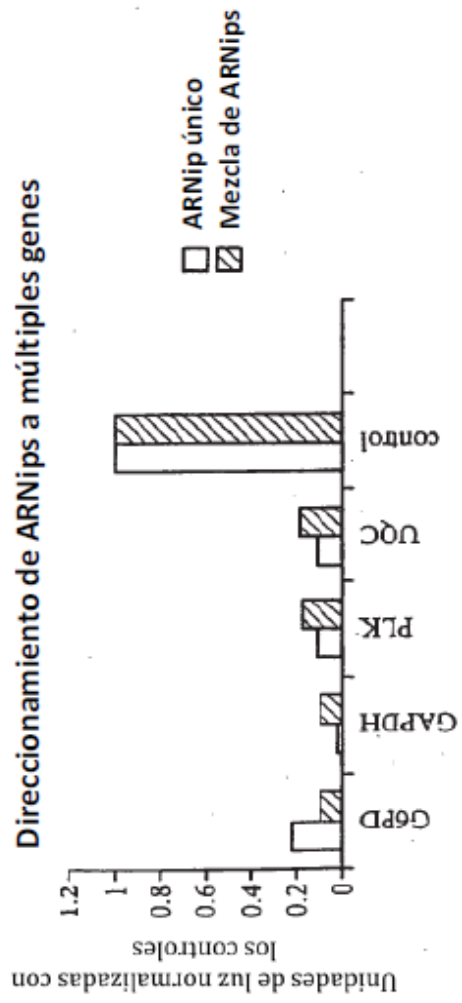


FIG. 24

Figura 25

Reducción de Bcl2 mediante 10 ARNips diseñados de manera racional a 300 pM de concentración

